

20
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"

"ENCAPSULACION DE EMBRIONES SOMATICOS
OBTENIDOS IN VITRO"

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
GERONIMO PEÑA CLIMACO



MEXICO, D. F.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

1988

TESIS CON
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.

Principales abreviaturas utilizadas.

ABA	Acido abscisico.
AIA	Acido indol-3-acético.
AIB	Acido indolbutírico.
AG ₃	Acido giberélico.
BAP	6-bencil-aminopurina.
BSA	Albúmina de suero bovino.
B ₅ e	Gamborg <u>et al.</u>
cps	Centipoises.
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilen dimetil tetracetato de sodio.
Kn	Kinetina
LS	Linsmaier y Skoog.
MS	Murashige y Skoog.
PEG	Polietilenglicol.
FMSF	Fenil metil sulfonil fluoruro.
rpm	Revoluciones por minuto.
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SH	Schenk y Hildebrandt.
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletetilendiamina.
TTC	Cloruro de trifeniltetrazoleo.
M	Micra.
2,4-D	Acido 2,4-diclorofenoxiacético.

CONTENIDO.

	Pag.
INDICE DE CUADROS.	1
INDICE DE GRAFICAS.	ii
INDICE DE FIGURAS.	ii
RESUMEN.	iii
I. INTRODUCCION.	1
II. HIPOTESIS.	4
A. Objetivos generales.	4
B. Objetivos particulares.	5
III. REVISION DE LITERATURA.	
A. Alfalfa.	6
A.1. Agronomía.	6
A.2. Embriogénesis sexual en alfalfa.	8
B. Apio.	10
B.1. Agronomía y características generales.	10
C. Propagación clonal por cultivo de tejidos vegetales.	12
C.1. Embriogénesis somática por cultivo de tejidos vegetales.	14
C.2. Eventos organizacionales en embriogénesis somática.	17
C.3. Embriogénesis somática en alfalfa.	22
C.4. Embriogénesis somática en apio.	28
D. Proteínas de reserva en semillas.	31
D.1. Proteínas embrio-específicas en embriogénesis somática.	33
E. Inmovilización y microencapsulación de material biológico.	35

	Pag.
E.1. Propiedades y estudios donde se utiliza alginato.	35
E.2. Propiedades y usos de las pectinas.	39
F. Encapsulación de embriones somáticos.	41
F.1. Potencial de semillas artificiales.	47
G. Peletizado de semillas.	49
 IV. MATERIALES Y METODOS.	 51
A. Material vegetativo.	51
B. Cultivo <u>in vitro</u> .	51
B.1. Preparación de medios y condiciones de cultivo.	51
B.2. Obtención de material aséptico.	52
C. Embriogénesis somática.	53
C.1. Inducción y desarrollo.	53
C.2. Germinación de embriones somáticos.	54
D. Manipulaciones realizadas en medio y condiciones de <u>cul</u> <u>tivo</u> , para obtener embriones somáticos de alta calidad.	55
D.1. Separación de las fases de inducción y desarrollo de embriones somáticos de alfalfa A 70.34 y apio tipo Tall Utah 52-70.	55
D.2. Efecto de casaminoácidos en el desarrollo de embrio nes somáticos de alfalfa A 70.34.	57
D.3. Efecto de casaminoácidos en la inducción de embrio nes somáticos de alfalfa A 70.34.	58
D.4. Efecto del ácido abscísico (ABA) en el desarrollo de embriones somáticos de alfalfa A 70.34.	59
D.5. Germinación de embriones somáticos de alfalfa A 70.34.	60
D.5.1. Germinación de embriones somáticos de <u>alfal</u> <u>fa</u> A 70.34 en 3 medios basales a 3 concentra ciones.	60

	Pag.
D.5.2. Germinación de embriones somáticos de alfalfa A 70.34 en presencia de diferentes reguladores del crecimiento a diferentes concentraciones.	60
E. Efecto de diferentes tipos de "stress" durante el desarrollo de embriones somáticos de alfalfa A 70.34 y Fl.1.	61
F. Análisis de proteínas de reserva 7 S y 11 S.	63
F.1. Extracción de proteínas de semillas de alfalfa y de embriones somáticos de alfalfa A 70.34 y Fl.1.	63
F.2. Separación de las proteínas de reserva 7 S y 11 S.	64
F.3. Cuantificación de proteínas por el método Bradford.	66
F.4. Caracterización del patrón de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.	68
G. Desarrollo de la matriz de encapsulación para embriones somáticos.	73
G.1. Producción de cápsulas de alginato y pectinato.	73
G.2. Redisolución de cápsulas de alginato y pectinato.	75
G.3. Difusión de nitrógeno de medio de cultivo a cápsulas.	76
H. Encapsulación de embriones somáticos.	78
H.1. Proceso de encapsulación.	78
H.2. Cinética de crecimiento y viabilidad de embriones somáticos de apio encapsulados en alginato y pectinato.	79
H.3. Encapsulación de embriones somáticos de apio con geles de alginato y pectinato en medio de cultivo y de embriones sometidos a un pretratamiento con frío y obscuridad.	80
I. Obtención de plántulas en condiciones de invernadero.	81

	Pag.
V. RESULTADOS Y DISCUSION.	83
A. Protocolos de embriogénesis somática.	83
B. Manipulaciones realizadas en medio y condiciones de cultivo para obtener embriones somáticos de alta calidad.	91
B.1. Separación de las fases de inducción y desarrollo de embriones somáticos de alfalfa A 70.34 y apio tipo Tall Utah 52-70.	91
B.2. Efecto de casaminoácidos en el desarrollo de embriones somáticos de alfalfa A 70.34.	98
B.3. Efecto de casaminoácidos en la inducción de embriones somáticos de alfalfa A 70.34.	105
B.4. Efecto del ácido abscísico (ABA) en el desarrollo de embriones somáticos de alfalfa A 70.34.	107
B.5. Germinación de embriones somáticos de alfalfa.	112
C. Efecto de diferentes tipos de "stress" durante el desarrollo de embriones somáticos de alfalfa A 70.34 y Fl.1.	115
D. Análisis de proteínas de reserva 7 S y 11 S.	123
E. Desarrollo de la matriz de encapsulación para embriones somáticos.	130
F. Encapsulación de embriones somáticos.	142
G. Obtención de plántulas en condiciones de invernadero.	156
VI. CONCLUSIONES.	157
VII. BIBLIOGRAFIA.	163
VIII. APENDICE.	178

INDICE DE CUADROS.

	Pag.
Cuadro 1.- Embriogénesis somática en alfalfa ...	23
Cuadro 2.- Embriogénesis somática por cultivo de ...	27
Cuadro 3.- Embriogénesis somática en apio ...	30
Cuadro 4.- Determinación de la concentración de gel ...	74
Cuadro 5.- Determinación de la concentración de gel ...	74
Cuadro 6.- Respuesta y rendimiento de embriones ...	92
Cuadro 7.- Rendimiento de embriones somáticos de ...	99
Cuadro 8.- Respuesta, rendimiento y germinación de ...	103
Cuadro 9.- Respuesta, rendimiento y germinación de ...	106
Cuadro 10.- Respuesta, rendimiento y germinación de ...	111
Cuadro 11.- Porcentajes de germinación de embriones ...	113
Cuadro 12.- Porcentajes de germinación de embriones ...	113
Cuadro 13.- Respuesta, rendimiento, contenido de ...	118
Cuadro 14.- Respuesta, rendimiento, contenido de ...	119
Cuadro 15.- Producción de cápsulas de alginato ...	132
Cuadro 16.- Producción de cápsulas de alginato ...	133
Cuadro 17.- Producción de cápsulas de alginato ...	134
Cuadro 18.- Producción de cápsulas de pectinato ...	137
Cuadro 19.- Tiempo de disolución en minutos, de ...	140
Cuadro 20.- Tiempo de disolución en minutos, de ...	141
Cuadro 21.- Porcentajes de viabilidad de embriones ...	149
Cuadro 22.- Porcentajes de conversión de embriones ...	150
Cuadro 23.- Porcentajes de conversión de embriones ...	153
Cuadro 24.- Porcentajes de conversión de embriones ...	155
Cuadro 25.- Porcentajes de plántulas de apio ...	156

INDICE DE GRAFICAS.

	Pag.
Gráfica 1.- Embriones somáticos obtenidos en peciolos ...	92
Gráfica 2.- Contenido de proteínas en embriones ...	96
Gráfica 3.- Curva tipo utilizada en la evaluación ...	97
Gráfica 4.- Embriones somáticos obtenidos en j... ..	100
Gráfica 5.- Producción y desarrollo de embriones ...	102
Gráfica 6.- Efecto de casaminoácidos (CASA) en los ...	104
Gráfica 7.- Producción y desarrollo de embriones ...	108
Gráfica 8.- Efecto de ácido abscísico (ABA) en los ...	109
Gráfica 9.- Producción de embriones somáticos en ...	116
Gráfica 10.- Producción de embriones somáticos en ...	117
Gráfica 11.- Desarrollo de embriones somáticos globular ...	121
Gráfica 12.- Desarrollo de embriones somáticos globular ...	122
Gráfica 13.- Difusión de nitrógeno de medio de cultivo ...	139
Gráfica 14.- Cinética de crecimiento (peso seco) ...	147
Gráfica 15.- Cinética de crecimiento (peso seco) ...	148
Gráfica 16.- Cinética de crecimiento (peso seco) ...	149

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1.- Diagrama de extracción de proteínas.	65
Figura 2.- Embriogénesis somática <u>in vitro</u> en alfalfa ...	86
Figura 3.- Porcentajes de embriones somáticos de ...	103
Figura 4.- Porcentajes de embriones somáticos de ...	111
Figura 5.- Porcentajes de embriones somáticos de ...	124
Figura 6.- Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS ...	127

RESUMEN.

La biotecnología de plantas es un campo de investigación que ha tenido en los últimos años un gran auge en países desarrollados. En nuestro país un área que puede ser impulsada y en la cual existe la infraestructura técnica y científica necesaria es en propagación clonal de plantas. De los sistemas de propagación clonal in vitro, la embriogénesis somática posee amplias perspectivas, para producir masivamente plantas de interés comercial o agrícola.

Como resultado de la presente investigación, se propone una metodología para el manejo de embriones somáticos en forma individualizada, a través de la encapsulación de embriones adventicios, en ella se siguieron dos líneas de trabajo:

1.) Lograr la obtención de embriones asexuales de alta calidad, en el sistema de embriogénesis somática de alfalfa (Medicago sativa L.), utilizando como principales criterios de calidad: la respuesta en embriogénesis, el rendimiento en el número de embriones, el contenido de proteínas de reserva 7 S y 11 S (marcador bioquímico) y la frecuencia de conversión de embriones somáticos.

2.) Desarrollar una metodología de encapsulación de embriones somáticos, lo que incluye: producir una matriz de encapsulación, que cubra, proteja y permita la germinación y desarrollo de embriones somáticos encapsulados, evaluando sus condiciones de producción, redisolución y manejo; y evaluar el comportamiento de los embriones en la matriz de encapsulación.

Con respecto al primer punto, se propone un nuevo protocolo de embriogénesis en alfalfa A 70.34, en donde se utilizan pecio--

los como fuente de inóculo. La inducción de la embriogénesis se llevó a cabo en medio B₅e suplementado con 1.0 mg/l de 2,4-D, 0.2 mg/l de Kn, 1.75 g/l de casaminoácidos (opcional), 30 g/l de sacarosa y 9 g/l de bacto agar, durante 12-15 días. Para la diferenciación de los embriones, se transfirieron los inóculos a medio de desarrollo (B₅e sin reguladores y suplementado con 1.75 g/l de casaminoácidos, 30 g/l de sacarosa y 9 g/l de bacto agar), durante 24-27 días. La germinación de embriones somáticos maduros se obtuvo en medio MS basal al 50 %, suplementado con 15 g/l de sacarosa, 0.01 mg/l de GA₃ y 8 g/l de bacto agar.

Se encontró que la respuesta de alfalfa A 70.34 (una línea cuya mayor aportación genética proviene de Medicago sativa), es relativamente baja cuando se parte de semilla (10-15 %), por selección recurrente se alcanzaron respuestas mayores al 90 %. En alfalfa Fl.1 (genotipo de Medicago falcata), la respuesta es comúnmente mayor al 90 %, sin selección recurrente.

Se separaron las fases de inducción y desarrollo de los sistemas de embriogénesis somática de alfalfa A 70.34 y apio, con lo que se obtuvieron: mejor morfología en los embriones, disminución en el grado de asincronía de las etapas de desarrollo embrionario y en alfalfa A 70.34 una mayor tasa de síntesis de proteínas de reserva 7 S y 11 S. Además, se probó el efecto de casaminoácidos en ambas fases de la ontogenia de los embriones somáticos de alfalfa A 70.34, encontrandose que 1.75 g/l de casaminoácidos en el medio de desarrollo, contribuye a aumentar el rendimiento y calidad de los embriones. Los casaminoácidos no son esenciales en la inducción de la embriogénesis somática de alfalfa A 70.34.

El ácido abscísico (0.1-1.0 mg/l), aplicado al medio de desarrollo, hace aumentar el grado de sincronía de embriones somáti

cos de alfalfa A 70.34.

Se probó el efecto de diferentes tipos de "stress" (hídrico, obscuridad, ABA, disminución en la fuente de carbono, etc.) en el desarrollo de embriones somáticos de alfalfa A 70.34 y Fl.1, la respuesta no se ve afectada por la presencia del "stress", no así el rendimiento que disminuye; pero en cambio se observó un incremento en la síntesis de proteínas de reserva, principalmente por efecto del ácido abscísico a 0.5 mg/l y por desarrollo de los embriones en completa obscuridad.

Se caracterizó el patrón de proteínas de reserva en embriones somáticos de alfalfa A 70.34 y Fl.1, se encontró que corresponde con el determinado en semillas. Las proteínas de reserva - 7 S y 11 S, pueden ser utilizadas como un marcador bioquímico del proceso de diferenciación de embriones somáticos de alfalfa, para aumentar la calidad de sus embriones.

En la segunda línea de trabajo, se encontró que el alginato de sodio al 1.25 % y el ácido poligalacturónico (pectinato) al 7.5 %, funcionan adecuadamente como matriz de encapsulación para contener embriones somáticos de apio y alfalfa; las cápsulas de alginato y pectinato se forman por reacción de intercambio iónico con cloruro de calcio 100-200 mM, estas tuvieron un diámetro de 4-6 mm, permiten la difusión de nutrimentos del medio de cultivo hacia las cápsulas y no limitan el desarrollo y germinación de embriones somáticos de estas dos especies, lo que se comprobó con la evaluación de las cinéticas de crecimiento de embriones de apio encapsulados y no encapsulados.

El cloruro de trifeníltetrazoleo al 0.1 %, es un buen indicador de la viabilidad de embriones somáticos de apio y alfalfa.

Con la inclusión de medio de cultivo en las cápsulas de alginato y pectinato y con un preacondicionamiento de embriones somáticos de apio se alcanzaron porcentajes de conversión de embriones encapsulados cercanos al 80 %, en comparación con los controles sin encapsular que fueron comúnmente del 90 %.

Con la aclimatación de plántulas de apio en invernadero, provenientes de embriones encapsulados y no encapsulados, se completó el sistema de propagación masiva in vitro de apio, que incluye la encapsulación de embriones somáticos.

La tecnología de producción de "semillas artificiales" está en el inicio en nuestro país. Al igual que en otras áreas de la biotecnología, es necesario una gran cantidad de trabajo constante y metódico, para aprovechar la riqueza de nuestros recursos.

I. INTRODUCCION.

El cultivo de tejidos vegetales es un término que abarca diferentes metodologías como: Obtención de plantas haploides, Obtención de plantas tolerantes a algún estrés ambiental, Obtención de metabolitos secundarios, Preservación de germoplasma, Recombinación de DNA, Fusión de protoplastos, Cultivo de meristemas para la obtención de plantas libres de virus y Micropropagación. De esta última los principales caminos para la regeneración de plantas in vitro son: propagación por ápices y yemas axilares, organogénesis (formación de organos adventicios) y embriogénesis somática (formación de embriones a partir de células que no son producto de fusión gamética).

En varios cientos de especies se ha logrado obtener embriones somáticos. Una de las principales aplicaciones de la embriogénesis no sexual es la posibilidad de producir semilla clonal o artificial a través de la encapsulación de embriones somáticos, como una alternativa a los altos costos que requiere la propagación clonal in vitro de especies vegetales económicamente importantes, mismos que hasta ahora han limitado en gran medida la aplicación comercial del cultivo de tejidos vegetales.

El impacto de la producción de semillas artificiales a bajo costo sería muy grande, ya que se utilizaría la infraestructura de los sistemas de producción de semillas sexuales, con lo que se podría incrementar la producción de cultivos importantes a partir de la propagación por semilla clonal, aprovechando principalmente los sistemas altamente mecanizados, como los utilizados en la siembra de semillas peletizadas.

La producción de semilla seleccionada requiere de altos costos, los cultivos destinados para la producción de semillas, generalmente ocupan zonas de altos rendimientos agrícolas, con suelos fértiles y con una amplia provisión de humedad. Los agricultores necesitan anualmente enormes cantidades de semillas para sus cultivos, en Estados Unidos cada año se utilizan 310 millones de Kg de semilla de maíz y 56 millones de Kg de semilla de sorgo (USDA, 1979).

El rendimiento de los campos destinados para la producción de semillas, se ve disminuído por una gran cantidad de factores como: sequías, plagas, heladas, etc., con lo que los costos de producción se ven incrementados al invertir en riego, plaguicidas, insumos, mayor uso de maquinaria y mano de obra.

Posteriormente, para la producción de semilla certificada son necesarios: maquinaria, instalaciones y trabajo para cosechar, secar la semilla, seleccionarla y almacenarla. Además la adición de fungicidas e insecticidas a las semillas para preservarlas en buenas condiciones, hace que aumenten los precios que el agricultor tiene que pagar al proveedor de semillas.

Para el desarrollo de la tecnología de producción de semillas artificiales a partir de la encapsulación de embriones somáticos se deben superar dos objetivos: primero, contar con uno o más sistemas de embriogénesis somática que produzcan embriones de alta calidad y segundo, desarrollar una matriz de encapsulación que proteja al embrión, pero que no limite su desarrollo, con la posibilidad de incluir diferentes componentes como: sales minerales, fertilizantes, reguladores del crecimiento e incluso microorganismos. La tecnología una vez probada en uno o dos sistemas de embriogénesis, se podría extrapolar a otras especies im

portantes donde el proceso embriogénico in vitro sea posible.

Una especie importante en donde se ha logrado regenerar plantas vía embriogénesis somática es la alfalfa (Medicago sativa L.) (McCoy y Walker, 1984), sus embriones somáticos presentan cualidades que los hacen buenos candidatos para ser encapsulados (Redenbaugh, 1986), poseen un tamaño adecuado para ser manejados (2 a 5 mm), los embriones pueden ser obtenidos en relativamente poco tiempo (5 a 7 semanas) y además es un sistema que ha sido estudiado ampliamente por cultivo de tejidos vegetales.

La alfalfa es una leguminosa forrajera muy utilizada en la alimentación de ganado, es importante por su alto contenido proteico, aunque presenta notable deficiencia en metionina, triptofano y cisteína.

La regeneración de plantas de alfalfa in vitro, parece estar controlada por tres factores: cantidad y tipo de reguladores del crecimiento utilizados exógenamente como fuente de auxina, - concentración de citocinina exógena y fuente y nivel de nitrógeno en el medio de regeneración (McCoy y Walker, 1984).

Otro sistema de embriogénesis somática que ha sido ampliamente estudiado es en apio (Apium graveolens L.) (Orton, 1984), la obtención de embriones a partir de hoja cotiledonar en presencia de 2,4-D es un hecho bien establecido (Vega, 1987).

La producción de semillas de origen no sexual ha sido propuesta por Murashige, (1978). Posteriormente, siguiendo este fin Kitto y Janick (1980), iniciaron trabajos de encapsulación con embriones sexuales de cítricos, a los cuales les sustituyeron sus cubiertas naturales, por una cubierta artificial.

Actualmente en Estados Unidos y Francia, se tiene ya la metodología establecida para la producción de semillas artificiales, pero en México apenas se están desarrollando trabajos sobre el tema, además es necesario crear metodologías acordes a las condiciones económicas y de desarrollo de nuestro país, para frenar la ya de por sí, gran dependencia económica y tecnológica con los países desarrollados.

II. H I P O T E S I S :

El sistema de embriogénesis somática in vitro que produzca embriones, con altos porcentajes de germinación y contenido de proteínas de reserva, será el más adecuado para producir semilla clonal vía encapsulación de embriones somáticos.

El alginato de sodio y el ácido poligalacturónico (pectinato), producen geles que permiten encapsular embriones somáticos obtenidos in vitro, las cápsulas que permitan el desarrollo y germinación de embriones encapsulados, serán las más adecuadas para la producción y manejo de embriones, como semilla clonal.

A. O B J E T I V O S G E N E R A L E S :

Obtener embriones somáticos in vitro de alta calidad, en uno o más sistemas de embriogénesis somática, por manipulación de las condiciones de cultivo.

Producir un análogo de una semilla sexual a través de la encapsulación de embriones somáticos obtenidos in vitro, utilizando geles que produzcan esferas que no limiten el desarrollo y germinación de embriones encapsulados.

B. OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1.- Optimizar el sistema para la obtención de embriones somáticos de alfalfa (Medicago sativa L.) línea A 70.34, por variación a los componentes de los medios de cultivo, así como el ajuste de la duración de las etapas de inducción, desarrollo y germinación.
- 2.- Evaluar, analizar y cuantificar la síntesis de proteínas de reserva 7 S y 11 S de embriones somáticos de alfalfa, (- líneas A 70.34 y Fl.1) durante el desarrollo, en condiciones similares a las que sufre un embrión sexual antes de entrar en latencia, con el fin de obtener embriones de alta calidad nutricional y con mayores perspectivas de supervivencia y germinación.
- 3.- Obtener masivamente embriones somáticos de apio (Apium graveolens L.) tipo Tall Utah 52-70, por medio de embriogénesis somática in vitro, para su encapsulación.
- 4.- Desarrollar una matriz de encapsulación en forma de esfera, - que cubra, proteja y permita la nutrición de embriones somáticos encapsulados, evaluando sus condiciones de producción, redisolución y manejo.
- 5.- Evaluar la germinación y desarrollo de embriones somáticos de apio encapsulados en alginato y pectinato.
- 6.- Obtener plántulas de apio aclimatadas en invernadero, provenientes de embriones somáticos encapsulados y no encapsulados.

III. REVISION DE LITERATURA.

A. ALFALFA.

A.1. Agronomía.

La alfalfa (Medicago sativa L.), es una de las especies forrajeras más productivas del mundo, actualmente se cultivan alrededor de 35 millones de hectáreas con esta especie (McCoy y Walker, 1984).

Se utiliza principalmente para la alimentación de ganado lechero, por su alto contenido proteico.

Medicago sativa, es una leguminosa originaria del cercano Oriente y centro de Asia. Irán constituye el centro geográfico que más comunmente se menciona como lugar de origen de la alfalfa, este cultivo se considera como la primera especie forrajera domesticada por el hombre.

Es una especie de polinización cruzada, tetraploide ($2n=32$) y depende de los insectos para su reproducción.

Lesins y Gillies (1972), describen a M. sativa como: hierba perenne, con flores color púrpura, vainas sin espinas y enrolladas en estrecha rosca, la vaina mide de 2 a 5 mm de diámetro y los pétalos presentan nervación paralela, asimismo indican que se conocen aproximadamente 62 especies pertenecientes al género Medicago.

Como leguminosa, la alfalfa tiene relación simbiótica mutua-

lista con la bacteria Rizhobium meliloti (Burton, 1972).

Es un cultivo de clima templado, los principales factores ambientales que la afectan son el frío y el exceso de lluvias. Varias enfermedades e insectos causan una sensible disminución en la producción de alfalfa. Barnes et al. (1977), indican que 21 enfermedades, 10 insectos y 3 nemátodos son los principales problemas patológicos en alfalfa, entre los más importantes están: la marchitez bacteriana (Corynebacterium insidiosum), la pudrición de la raíz (Phytophthora megasperma), la antracnosis (Colletotrichum trifolii) y la enfermedad de las hojas (Pseudopeziza medicaginis).

A.2. Embriogénesis sexual en alfalfa.

La polinización de alfalfa la realizan principalmente los insectos, en condiciones naturales del 80 al 90 % de la fecundación es cruzada, entre los principales insectos polinizadores están los géneros Nomia, Bombus y Apis (Barnes et al., 1977).

La fecundación generalmente ocurre entre las 24 y 27 horas posteriores a la polinización. Por lo común sólo un tubo polínico penetra en el micrópilo y entra luego al saco embrionario, - entre las sinérgidas y la ovocélula. Las sinérgidas no son destruidas por el tubo polínico, sino que persisten algún tiempo después de la fecundación (Stanford et al., 1972).

El tubo polínico libera los dos gametos masculinos cerca de la ovocélula. Un gameto se adhiere al núcleo de ésta mientras - que el otro se une a los núcleos polares que se fusionan para formar la célula madre del endospermo. El núcleo del gameto masculino, que está adherido al núcleo de la ovocélula aumenta de tamaño, y por último se fusiona con la cromatina de los dos núcleos. El cigoto se divide transversalmente, alrededor de 31 horas después de la polinización se produce un proembrión bicelular que consiste en una célula basal agrandada y otra apical más pequeña. Después de 120 horas de que ocurrió la polinización, el embrión con tiene hasta 16 células (Stanford et al., 1972).

Fridriksson y Bolton (1963), describen el desarrollo del embrión: Las células del cigoto se dividen en sentido transversal y periclinal para formar una masa esférica (estado globular), el embrión tiene entonces una simetría radial. Al principio esta masa esférica es de aproximadamente 0.2 mm de diámetro pero llega

a 0.6 mm antes de que la organogénesis de los cotiledones comience.

Posteriormente ciertos grupos de células de los lados opuestos de la periferia del ápice se transforman en meristemáticos para producir los cotiledones, en este punto el embrión tiene una forma acorazada. Luego los cotiledones se alargan y ocupan una posición paralela al eje principal y producen el estado de "torpedo".

Los cordones provasculares se diferencian tempranamente en el embrión. En el embrión maduro, los primordios de las nuevas hojas están en el ápice del tallo.

Los primeros eventos organizacionales en la embriogénesis sexual son similares tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas, pero en etapas posteriores se aprecian diferencias, una de ellas es la deposición de proteínas de reserva.

Alrededor de la mitad y etapas finales del desarrollo del embrión, ocurre la síntesis de proteínas de reserva, que serán la fuente de nitrógeno durante la germinación. A diferencia de las semillas de cereales, en leguminosas el endospermo no es el sitio primario de acumulación de proteínas de reserva, sino el embrión mismo (Larkins, 1981; en Villegas, 1986).

En muchas leguminosas el endospermo es consumido a medida que son formados el eje embrionario y los cotiledones, estos últimos forman la mayor parte del embrión y la semilla.

Una característica de las semillas de alfalfa es que pueden permanecer en latencia por largos períodos (hasta 10 años), mientras no tengan condiciones favorables para germinar.

B. APIO.

B.1. Agronomía y características generales.

El apio (Apium graveolens L.), pertenece a la familia Umbelliferae, su origen se sitúa en el sureste de Europa y la costa mediterránea de Asia menor, probablemente los Griegos, hace 3,000 años lo utilizaron como medicina y condimento (Orton, 1984).

Actualmente el apio tiene gran aceptación en Europa y Estados Unidos, de aquí su importancia como producto de exportación.

De la especie A. graveolens tres variedades son cultivadas a nivel mundial: variedad Dulce (Mill) Pers.; var. Rapaceum (Mill) Gared Beaup y var. Secalium (Mill), la primera variedad se divide en dos tipos: el blanco dorado y el verde o Utah. En nuestro país los tipos que tienen mayor área de cultivo son; Tall Utah - 52-70 y Florida (Veza, 1987).

El apio es una planta herbácea bienal que crece aproximadamente un metro, su número cromosómico diploide es $2n = 22 = 2x$.

Como planta adulta presenta pecíolos nervados, anchos en la base y con gran acumulación de granos de almidón, posee un sistema radicular poco extenso. En el primer año de desarrollo la planta produce un tallo corto y rígido de 7.5 a 15.0 cm de largo, en el segundo año nace el tallo floral, muy ramificado, alcanzando en la madurez una altura de 60 a 90 cm. Las flores, pequeñas e individuales (2 a 3 mm), son de color blanco verdoso y tienen la característica de autopolinizarse (Jacobsen et al., 1979).

La semilla madura mide de 1.5 a 2.0 mm de longitud, presenta un embrión pequeño; localizado en la parte central de la semilla,

rodeado por el endospermo, la semilla presenta latencia, que se rompe cuando es cultivada in vitro en presencia de humedad y luz continua (Vega, 1987).

El proceso de germinación de semillas de apio se inicia con la elongación del embrión dentro de la semilla, aumenta el tamaño de los cotiledones y al sexto día la radícula penetra completamente en el endospermo y la cubierta de la semilla. A medida que los cotiledones y la radícula se elongan, el endospermo se va degradando progresivamente, el tipo de germinación es epigeo, presentando dos cotiledones alargados y fotosintéticos.

El método de propagación tradicional de apio es por semilla, resultando plántulas pequeñas y con alta susceptibilidad a variaciones ambientales. Para obtener un mejor desarrollo es práctica común el uso de almácigos, el crecimiento de la plántula es lento, principalmente en los estadios tempranos, el trasplante a campo se realiza cuando la plántula alcanza de 10 a 15 cm de altura, proceso que toma de 6 a 10 semanas.

Es un cultivo de clima templado, necesita una buena provisión de agua, altos niveles de nitrógeno (23 Kg/ha), sulfatos (46 Kg/ha) y potasio (46 Kg/ha), con un óptimo de temperatura para su desarrollo entre 20 y 22 °C (Orton, 1984).

En nuestro país se siembra todo el año en las zonas de Xochimilco, Tláhuac y el Bajío y en los estados de Baja California y Sonora en los meses de octubre y noviembre (Vega, 1987).

C. PROPAGACION CLONAL POR CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.

La propagación clonal in vitro, posee un gran potencial para producir a gran escala plantas de interés comercial, es crítica cuando se tiene germoplasma de alta calidad y no se quiere que se experimente meiosis y recombinación genética, como es el caso común de la reproducción sexual (Redenbaugh et al., 1986).

Algunas especies vegetales son propagadas vegetativamente in vitro a nivel comercial; fresa, papa, espárrago, helechos, - clavel y jitomate (Sharp et al., 1984; Redenbaugh et al., 1986).

Ha habido poco uso comercial del cultivo de tejidos en la producción de mayor número de especies vegetales porque los métodos utilizados requieren intenso trabajo manual, se obtienen bajos volúmenes de producción y el costo por unidad es más alto en comparación con las prácticas agrícolas actuales (Lutz et al., 1985).

Los métodos de multiplicación vegetativa in vitro más comunes son: propagación por yemas axilares, meristemas y ápices; organogénesis y embriogénesis somática.

El primer método implica colocar el tejido en un medio de proliferación para inducir la producción y desarrollo de brotes, éstos son reciclados (medio de multiplicación), hasta que se obtiene el nivel de producción deseado, posteriormente los brotes se enraizan y finalmente se aclimatan en invernadero, usualmente se obtienen de 5 a 10 propágulos por ciclo de cultivo, de este modo se propaga clavel (Navarro, 1985) y otros cultivos como crisantemo y fresa. Algunas de sus ventajas son: es posible obtener plantas libres de virus y la variación fenotípica es menor, compa

rada con otros sistemas de propagación clonal (Hu y Wang, 1983), sin embargo el método requiere una gran cantidad de trabajo manual.

Por otro lado el proceso organogénico requiere la formación de brotes o raíces adventicias, ya sea directamente del inóculo (hoja, tallo, raíz, pecíolo, etc.) o con intervención de una fase de callo, los brotes deben enraizarse y posteriormente aclimatarse en invernadero, este método requiere menos manipulaciones que el anterior, pero necesita una mayor cantidad de fuente de inóculo y se obtiene una baja cantidad de propágulos (Styer, 1985).

La producción de plantas vía embriogénesis somática es el método de propagación in vitro que muchos investigadores consideran con mayor potencialidad (Lutz et al., 1985; Ammirato, 1987; Gupta y Durzan, 1987).

La embriogénesis somática proporciona muchas ventajas: gran cantidad de embriones, en muchas líneas celulares de zanahoria se pueden obtener millones de embriones somáticos en cultivos en suspensión o biorreactores (Sung et al., 1984; Styer, 1985); presencia de meristemas radical y apical en el mismo embrión (bipolaridad); mayor facilidad de manipulación y escalamiento: la posibilidad de inducir latencia en los embriones (Ammirato, 1987); la acumulación de reservas energéticas a utilizar en el proceso de conversión y la producción de semilla clonal a través de la encapsulación de embriones somáticos (Redenbaugh et al., 1984), con la opción de optimizar el proceso, hacerlo altamente mecanizado y a bajo costo.

C.1. Embriogénesis somática por cultivo de tejidos vegetales.

La célula es la unidad fundamental de los organismos vivos y sólo pueden aparecer nuevas células a partir de las preexistentes, tales son los postulados de la teoría celular propuesta por Schwann y Schleiden en 1838, las primeras investigaciones en cultivo de tejidos vegetales se avocaron a comprobar esta teoría.

Teóricamente cualquier célula de una planta tiene la capacidad de regenerar una planta completa, a esta característica se le conoce como totipotencia.

La regeneración puede obtenerse por organogénesis o por embriogénesis asexual, ambos procesos son comunes tanto in vivo como in vitro. Tisserat et al. (1979), indican que se han reportado 59 familias de angiospermas que incluyen 239 especies donde se ha observado embriogénesis asexual in vivo. Además reportan que hasta entonces se había logrado regenerar a 132 especies de 32 familias por embriogénesis somática in vitro, a la fecha el número de especies regeneradas por esta vía debe ser mucho mayor.

El proceso de embriogénesis asexual ha sido identificado con diferentes términos: apomixis; poliembrionia; embriogénesis nucelar, esporofítica, adventicia y somática. En el caso de embriogénesis in vitro, un término general y de uso común es embriogénesis somática o adventicia, mismo que emplearemos aquí.

En especies que presentan embriogénesis asexual natural se ha observado que tiene su origen en tejidos específicos: endospermo, integumento interior, células antipodales, suspensor y el mismo embrión cigótico, como regla general la embriogénesis asexual in vivo ha sido confinada a estructuras intraovulares (-

Tisserat et al., 1979), ejemplos importantes, en la familia Ana cardiacea el género Mangifera sp. y en las Rutaceas el género - Citrus sp. (Litz, 1987).

En el caso de la embriogénesis somática in vitro, existe una gran variedad de tejidos y órganos de donde se han obtenido em--briones adventicios (tallo, hoja, endospermo, cotiledón, hipocótilo, embrión cigótico, raíz, peciolo, etc.).

Hace 30 años que fueron publicados los primeros reportes de regeneración vía embriogénesis somática en zanahoria (Daucus - carota), desde entonces se han publicado una gran cantidad de es tudios para obtener embriones somáticos.

En términos generales la respuesta embriogénica en una espe- cie se ve afectada por: el genotipo y edad del infóculo; tipo y concentración de sales inorgánicas y aditivos orgánicos; resulad~~o~~os del crecimiento y condiciones de incubación. Como es de no- tar muchas variables están involucradas en la regeneración in vi- tro por embriogénesis somática, lo cual constituye un reto que - puede ser superado con trabajo constante y metódico, analizando - no factores aislados, sino el comportamiento integral del cultivo.

El proceso embriogénico asexual puede seguir dos grandes pa- trones de desarrollo: 1) embriogénesis directa, en la cual los - embriones se originan directamente del tejido en ausencia de pro- liferación de callo (proceso seguido principalmente en la em- briogénesis asexual in vivo) y 2) embriogénesis indirecta, en donde para el desarrollo de un embrión es un prerrequisito la for- mación de una masa de células relativamente organizadas llamada callo (Sharp et al., 1980)

En la mayoría de los reportes de regeneración in vitro vía

embriogénesis somática se sigue la ruta indirecta.

En un cultivo in vitro, las células pueden clasificarse en competentes y determinadas. El término competencia se le asigna a las células que poseen la información genética necesaria para tomar un camino de diferenciación (embriogénesis somática u organogénesis), cuando son colocadas en condiciones de cultivo a adecuadas (Ammirato, 1987; Christianson, 1985). Una vez competente un tejido responde al balance hormonal de un medio y experimenta inducción hacia un camino de diferenciación. La determinación, se refiere a células que ya tomaron un camino de diferenciación, en este proceso el potencial de desarrollo viene a ser restringido a un camino particular (Ammirato, 1983; Litz, 1987).

Aunque no existe duda de que hay células competentes y determinadas en plantas superiores, no se conoce aún si estas propiedades son de células individuales o de grupo (Christianson, 1987), porque no todas las células de un inóculo se dividen, ni mucho menos terminan su desarrollo en una planta. En callos de una variedad es posible distinguir diferentes tipos de células, desde simples diferencias en forma, color y textura, pasando por las que tienen respuesta embriogénica o no (Sondhal y Sharp, - 1977), hasta las que tienen diferencias a nivel bioquímico en su contenido de proteínas, como es el caso de callos embriogénicos y no embriogénicos de zanahoria, chícharo y arroz (Choi y Zung, 1984; Stirn y Jacobsen, 1987; Chen y Luthe, 1987).

La importancia del proceso de embriogénesis somática, radica en que los embriones somáticos siguen durante su desarrollo las etapas morfológicas características de la embriogénesis sexual (Ammirato, 1983; Dos Santos et al., 1983; Sung et al., - 1984).

C.2. Eventos organizacionales en embriogénesis somática.

Las principales etapas de desarrollo del proceso de embriogénesis somática pueden ser divididas en amplias categorías: Inducción, Desarrollo y Conversión o Germinación (Ammirato, - 1987).

Inducción.

El proceso de inducción puede ocurrir en una de dos formas: los tejidos de algunas especies sólo necesitan ser colocados en un medio basal y las células comienzan a ser embriogénicas (presencia de células determinadas pre-embriogénicamente), otros deben ser colocados en un medio más complejo, con reguladores del crecimiento proporcionados exógenamente. En el primer caso, las células son ya determinadas y sólo necesitan las condiciones adecuadas para producir embriones somáticos, sin la intervención de una fase de callo (embriogénesis directa). En el segundo las células se dediferencian y reproducen formando callo (embriogénesis indirecta), estas células pueden encontrarse en estado competente y pasar al estado de determinación, donde pueden en ocasiones observarse estructuras proembrionarias, la producción de callo es típica cuando se sigue la ruta de embriogénesis indirecta.

Desarrollo.

En algunos casos como alfalfa el desarrollo de embriones somáticos puede obtenerse en el mismo medio de inducción (Meijer y Brown, 1987). En zanahoria el desarrollo sólo se inicia cuando el callo es transferido de un medio con reguladores (usualmente 2,4-D) a un medio sin reguladores (Sung et al., 1984).

El desarrollo de embriones somáticos in vitro exhibe los estados morfogénéticos característicos de la embriogénesis sexual (estados globular, corazón y torpedo). El estado globular se caracteriza por presentar una estructura esférica de células con citoplasma denso, grandes granos de almidón, núcleos prominentes y poco vacuoladas, las mismas características se presentan en células embrionarias sexuales y meristemáticas (Sharp et al., - 1980; Dos Santos et al., 1983). Posteriormente en los embriones somáticos se observan centros de actividad celular que darán origen a los primordios cotiledonares, en este momento el embrión adquiere una típica forma de corazón, finalmente con la elongación de los cotiledones y el desarrollo del meristemo apical el embrión llega a la etapa de torpedo (Ammirato, 1987).

Conversión.

La germinación o conversión del embrión somático es la última etapa del desarrollo de un embrión para llegar a plántula. En la conversión de embriones somáticos generalmente no se requieren reguladores del crecimiento y en ocasiones sólo las sales al 50 % de algún medio de cultivo. Desafortunadamente la mayoría de los reportes en embriogénesis somática no indican porcentajes de conversión, los estudios se centran principalmente en el proceso de embriogénesis, en los factores que la controlan y en tener la seguridad de obtener por conversión algunas plántulas. Tampoco indican que porcentajes de las plántulas obtenidas, sobreviven en condiciones de invernadero. Esto es probablemente debido a que no se tiene un criterio bioquímico que diagnostique calidad y vigor de un embrión durante su desarrollo. Con los porcentajes de conversión únicamente se comprueba si un embrión es de calidad al final de su desarrollo, pero no nos indica que

factores pudieron haberse cambiado durante su desarrollo, para asegurar su conversión. Este es el fin del análisis de proteínas de reserva, utilizarlas como un marcador bioquímico para determinar las condiciones necesarias in vitro para obtener embriones somáticos de alta calidad.

Aún cuando se ha reportado que cientos de especies pueden tomar el camino embriogénico in vitro, existen muchos retos a superar. Ammirato (1987), se refiere a los principales: 1) El proceso embriogénico es repetitivo, el embrión mismo puede ser cen--tro de embriogénesis y desarrollar embriones secundarios en la base de la radícula, ésto es causa de uno de los principales problemas en embriogénesis somática, la falta de sincronía en las diferentes fases de desarrollo, de aquí la importancia de separar las fases de inducción y desarrollo proporcionando "pulsos" cortos (pulso - exposición del inóculo a reguladores o a algún otra variable), para evitar la continua acción de los reguladores del crecimiento, 2) Pueden existir embriones dobles, triples o en grupos que al germinar generan brotes múltiples. 3) El desarro--llo de los cotiledones puede ser anormal, poseer uno, dos o más - en un solo eje embrionario, su desarrollo puede ser pobre o in--cluso estar fusionados o incompletos. 4) El embrión cuyo desarrollo fue normal puede no germinar o hacerlo parcialmente con aparición sólo de brotes o raíces. 5) Algunas etapas de desarrollo, - pueden ser muy rápidas, lentas o no presentarse. 6) Como embrión al fin de su desarrollo no presenta ningún tipo de latencia, como el que experimentan embriones de origen sexual. 7) Finalmente no se han encontrado las condiciones para que los embriones somáticos acumulen sustancias de reserva utilizables durante la germinación.

Algunos de los problemas anteriores pueden ser solucionados

optimizando las condiciones particulares de un sistema de embriogénesis somática.

El conocimiento de los eventos bioquímicos y fisiológicos del proceso embriogénico proporcionará más elementos para la aplicación comercial de esta forma de propagación clonal.

Usando como modelo la zanahoria, ha sido posible regular el proceso de embriogénesis somática por la adición de poliaminas - (espermidina, espermina y putrescina) al medio de desarrollo (Bradley et al., 1984; Feirer et al., 1984). Por otro lado - comprobando estas observaciones Feirer et al. (1985), encontraron que la adición de inhibidores de síntesis de poliaminas especialmente de espermidina trajo consigo la reducción del desarrollo embriogénico en zanahoria. Sin embargo Litz y Schaffer (-- 1987), han encontrado que al adicionar poliaminas al medio de cultivo no afectan el inicio de la embriogénesis somática en tejido nucelar de mango, incluso la espermidina inhibió el desarrollo de callo en uno de los cultivares estudiados. En el mismo estudio Litz y Schaffer encontraron que la embriogénesis somática proveniente de tejido nucelar de mango, no es dependiente del estímulo con 2,4-D, explican que el papel del 2,4-D puede ser el de clonar células determinadas pre-embriogénicamente, hasta que una suficiente densidad de células permite una alta respuesta embriogénica. Sugieren que el estudio a nivel bioquímico del desarrollo in vitro puede proporcionar mayor comprensión de los mecanismos que controlan la embriogénesis somática, aunque finalmente no aportan pruebas que comprueben su teoría.

Otro grupo de sustancias que se cree que tienen actividad moduladora en embriogénesis somática son las oligosacarinas (oligosacáridos capaces de regular procesos fisiológicos). En ta

baco se ha reportado la modulación de la regeneración de plantas por oligosacarinas (Darvill, 1985).

Los estudios realizados hasta la fecha, indican que el conocimiento de los procesos morfogénéticos de plantas desarrolladas in vitro es disperso y que se necesita una gran cantidad de investigación tanto a nivel básico como aplicativo.

C.3. Embriogénesis somática en alfalfa.

Los primeros reportes de regeneración in vitro de alfalfa (Medicago sativa L.), fueron publicados a partir de 1972 por el grupo de E. T. Bingham de la Universidad de Winsconsin.

La organogénesis fue el camino de regeneración de alfalfa - hasta principios de la década de los 80's (Stavarek et al., 1980; Reisch y Bingham, 1980) a partir de entonces la mayoría de las publicaciones son vía embriogénesis somática.

Para la propagación de Medicago, prácticamente se utiliza cualquier parte de la planta, predominando el uso de tejidos jóvenes como hipocótilo y cotiledón.

El cuadro 1 muestra una revisión de estudios sobre regeneración de alfalfa por embriogénesis somática, en donde se resalta: el genotipo, fuente de inóculo, medios de cultivo y reguladores del crecimiento.

Una característica importante de la regeneración in vitro de alfalfa es su fuerte dependencia del genotipo, como lo demuestran los estudios de Mitten et al. (1984) y Brown y Atanassov (1985), quienes determinan, estudiando 35 y 76 cultivares respectivamente, que existe una mayor respuesta embriogénica cuando la variedad en cuestión posee una mayor contribución genética de Medicago falcata que de Medicago sativa.

Los porcentajes de regeneración en alfalfa son muy variables, dependiendo de la fuente de genoplasma, de cultivar a cultivar y de planta a planta, por su característica de ser una especie predominantemente de polinización cruzada y consecuentemente con alta variabilidad genética.

Cuadro 1.- Embriogénesis somática en alfalfa (*Medicago sativa* L.).

Variedad	Inóculo	Medios y reguladores (mg/l)			Ref.
		Inducción	Desarrollo	Conversión.	
Regen S	Ovario y pecíolo	SH 4.65 ANA 2.15 Kn	SH 11 2,4-D 1.08 Kn	SH 0.05 ANA 10 GA ₃	143
A-15	Hipocótilo cotiledón pecíolo y hoja	Boi 22 2,4-D 1.08 Kn	Boi 0.2 ANA 2.15 Kn	Boi S/R	97
Lucerna	Cotiledón hipocótilo	MS 2 2,4-D 0.25 BAP	MS S/R	Boi S/R	76
Saranac	Hipocótilo	Boi 2 2,4-D 2 Kn	Boi S/R	Boi S/R	45
Ladak ^a Norseman Turkistan Nomad	Hipocótilo	SH 4.65 ANA 2.15 Kn	SH 11 2,4-D 1.08 Kn	Boi S/R	86
Regen S	Ovario y pecíolo	SH 4.65 ANA 2.15 Kn	SH 11 2,4-D 1.08 Kn	---	114
Rangelan ^b der Regen S Kane SCMF3713	Cotiledón hipocótilo	B ₅ h 1 2,4-D 0.2 Kn 6 SH 11 2,4-D 1 Kn	Boi S/R	SH 0.02 ANA	13
Br 1 ^c Le 1 Heirichs	Raíz e hipocótilo	SH 1 2,4-D 21.5 Kn 6 LS 1 ANA 6 Kn 6 SH 11.2 2,4-D 1.08 Kn	--- ---	SH S/R LS S/R Boi S/R	94

Continúa ...

Cuadro 1.- Continuación...

Variedad	Inóculo	Medios y reguladores (mg/l)				Ref.
		Inducción	Desarrollo	Conversión		
Heirichs	Raíz e hipocótilo	Boi 2 2,4-D 2 Kn 6 SH 11.2 2,4-D 1.08 Kn	Boi	S/R	Boi S/R	95
Fl.1	Pecíolo hipocótilo hoja	MS 5 2,4-D 1 Kn	MS	S/R	MS S/R	83

a - más 31 variedades; b - más 72 variedades; c - más 7 variedades; se presentan las variedades con mayor respuesta.

Abreviaturas:

MS	Murashige y Skoog (1962)	GA ₃	ácido giberélico
SH	Schenk y Hildebrandt (1972)	2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoxyacético
LS	Linsmaier y Skoog (1965)	ANA	ácido naftalenacético
Boi	Blaydes (1966)	Kn	Kinetina
B ₅	Gaborg <u>et al.</u> (1968); modificado (Brown y Atanassov, 1935).	S/R	Sin reguladores

Una forma de obtener altas respuestas embriogénicas es seleccionar y clonar plantas embriogénicas mediante un proceso conocido como "selección recurrente" (mismo que fue empleado en este estudio).

Los ciclos de selección recurrente pueden incrementar una frecuencia de regeneración de menos del 10 % hasta 70, 80 ó incluso el 100 %. De hecho, la variedad Regen S, de donde se han obtenido diferentes líneas que han servido para varios estudios en embriogénesis somática, proviene de una selección y cruce de sólo 5 genotipos, 4 provenientes de la variedad Saranac y 1 de la variedad Dupuits (McCoy y Walker, 1984), estas variedades de acuerdo con Brown y Atanassov (1985), poseen baja respuesta embriogénica.

La selección recurrente indica que el proceso embriogénico es heredable. Reisch y Bingham (1980), plantean que la capacidad de regeneración en alfalfa puede estar controlada por dos genes que denominan Rn_1 y Rn_2 , sin embargo no aportan evidencias experimentales suficientes para comprobar su aseveración. Brown y Atanassov (1985), creen que el número de genes implicados debe ser mayor al observar la respuesta de 76 cultivares.

La regeneración in vitro de alfalfa vía embriogénesis somática, parece estar controlada por tres factores: 1) tipo y cantidad de regulador de crecimiento usado como fuente de auxina, 2) concentración de citocinina endógena y 3) nivel y fuente de nitrógeno reducido en el medio de regeneración (McCoy y Walker, 1984). Se necesita un mínimo de 25 mM de NH_4^+ para la diferenciación de embriones somáticos de alfalfa (McCoy y Walker, 1984). La adición de aminoácidos (caseína hidrolizada), mejora la cantidad y posiblemente la calidad de embriones somáticos (Meijer y Brown,

1987), específicamente prolina, alanina, arginina y glutamina (Stuart et al., 1985). Los reguladores del crecimiento se utilizan para la inducción de la embriogénesis, comúnmente se emplea una auxina o una combinación auxina-citocinina. Para el desarrollo se disminuye o eliminan los reguladores del crecimiento. La conversión generalmente se lleva a cabo en un medio sin reguladores, aunque existen reportes donde se utilizan bajas concentraciones de auxinas y giberelinas (Dos Santos et al., 1983; Brown y Atanassov, 1985). Con respecto a la fuente de carbono Meijer y Brown (1987), han verificado que el 3 % de sacarosa usado comúnmente en los medios de cultivo es la concentración más adecuada y no hay razón para variarla.

A partir de cultivo de protoplastos también se han obtenido embriones somáticos. El cuadro 2 contiene una revisión de estudios sobre regeneración de alfalfa por cultivo de protoplastos. En estos reportes se observa que la embriogénesis somática puede ser obtenida en diferentes condiciones a partir de callo o directamente de tejido de hoja, es de notar la carencia de estudios sobre fusión de protoplastos en alfalfa.

Recientemente, Groose y Bingham (1984) y Nagarajan y Walton (1987), han estudiado diferentes características de plantas regeneradas in vitro de alfalfa por variación somaclonal, aprovechando la variabilidad genética per se que proporciona el desarrollo y regeneración a partir de callo.

Con respecto a la selección in vitro de alfalfa Croughan et al. (1978), seleccionan líneas celulares tolerantes a 1 % de NaCl en el medio de cultivo. Reisch y Bingham (1981), obtienen el desarrollo de plantas resistentes a etionina, un análogo de la metionina.

Cuadro 2.- Embriogenesis somática por cultivo de protoplastos en Medicago sativa L.

Variedad	Inóculo	Medios y reguladores (mg/l)				Ref.
		Cultivo	Inducción	Desarrollo	Conversión	
Canadian	Hoja	Kao	Kao 0.1 Zea 1 2,4-D	---	Kao S/R	55
Lucerna	Hoja	Kao 0.2 2,4-D 1 ANA	UM 2 2,4-D 0.25 Kn	MS 0.05 ANA 0.5 BAP	MS S/R	29
Regen S	Callo de pecíolo	---	SH 11 2,4-D	Boi S/R	SH 0.05 ANA 10 GA ₃	53
Citation Answer Regen S	Callo de cot., hip. y hoja	Kao o B ₅ 1 2,4-D 0.5 Kn	SH 11 2,4-D 1 Kn	Boi o LS S/R	SH S/R	6
Rangelander Regen S	Hoja	Kao	NR	NR	NR	27

Kao	Kao (1977)	GA ₃	ácido geberélico
UM	Uchimiya y Murashige (1974)	2,4-D	ácido 2,4-diclorofenoxi- acético
MS	Murashige y Skoog (1962)	ANA	ácido naftalenacético
Boi	Blaydes (1966)	Zea	Zeatina
SH	Schenk y Hildebrandt (1972)	BAP	Bencil amino purina
LS	Linsmaier y Skoog (1965)	Kn	Kinetina
B ₅	Gamborg <u>et al.</u> (1968)	NR	No reportó

C.4. Embriogénesis somática en apio.

Williams y Collin (1976), fueron los primeros en publicar la regeneración in vitro vía embriogénesis somática en apio (Apium graveolens L.), en su estudio utilizaron cultivos de células en suspensión, en donde obtuvieron: embriones somáticos en diferentes fases de desarrollo, grupos de células y estructuras radiculares, a este respecto sugieren que la organogénesis puede ocurrir cambiando condiciones de cultivo.

En apio el desarrollo de embriones somáticos puede ser obtenido en el mismo medio de inducción, incluso de nuestros resultados el proceso completo de embriogénesis (inducción, desarrollo y conversión), es posible obtenerlo en un solo medio, no obstante es preferible separar cada etapa de desarrollo porque en un solo medio la continua acción de la auxina 2,4-D, redundaría en bajos porcentajes de germinación y poblaciones altamente asincrónicas.

A diferencia de alfalfa, en apio el genotipo no es un factor determinante para la regeneración de plantas por embriogénesis somática, en cambio la proporción auxina-citocinina es crítica para lograr la obtención de embriones somáticos (Orton, 1984), otro factor que parece ser importante es la fuente de nitrógeno. Al-Abta y Collin (1978), en uno de los pocos trabajos donde se estudió el efecto de la fuente y nivel de nitrógeno en apio, encuentran que el incremento al doble en la concentración de amonio en el medio de desarrollo (MS), aumenta la cantidad de embriones obtenidos, sin embargo, cuando se triplica o cuadruplica la concentración de amonio, se inhibe el desarrollo embriogénico, quedando los embriones en estado globular. En el mismo estudio confirman que el 3 % de sacarosa usado como fuente de carbono es la concen-

tración más adecuada para el desarrollo de embriones somáticos de apio.

En el cuadro 3 se presentan diferentes estudios de embriogénesis somática en apio, se aprecia que la fuente de inóculo ha sido comúnmente pecíolos y en algunos casos hipocótilo y que el medio empleado es por lo común el propuesto por Murashige y Skoog (1962).

El desarrollo embriogénico de apio, sigue el patrón general de otras especies cultivadas in vitro, es decir se presenta la secuencia de fases de desarrollo globular, corazón y torpedo (Al-Abta y Collin, 1978; Zee y Wu, 1979; Vega, 1987).

Al igual que en otras especies el sistema de embriogénesis somática de apio, produce poblaciones de embriones con asincronía en sus fases de desarrollo. Al-Abta y Collin (1978), obtienen sincronía en la etapa globular al someter a callos embriogénicos a altas concentraciones de sacarosa y amonio, desafortunadamente esta sincronía se pierde con el desarrollo posterior.

Como fue propuesto por Vega (1987), el sistema de embriogénesis somática de apio posee un amplio potencial para ser usado como un modelo biológico, desde la aplicación biotecnológica (producción de semillas artificiales), hasta estudios en biología básica (análisis de proteínas embriogénicas). El trabajo realizado por Vega (1987), permitió usar el sistema de apio para desarrollar algunos aspectos de la tecnología de producción de semilla clonal.

Cuadro 3.- Embriogénesis somática en apio (Apium graveolens L.)
Dulce (Mill) Pers.

Cultivar	Inóculo	Reguladores del crecimiento (M)			Ref.
		Inducción	Desarrollo	Conversión	
Latham Blanching	Pecíolos	0.23 2,4-D	0.23 2,4-D	S/R	107
Latham Blanching	Pecíolos internos	2.2 2,4-D 2.7 Kn	2.2 2,4-D _L 2.7 Kn	S/R	144
Latham Self Blanching	Pecíolos	2.2 2,4-D 2.7 Kn	2.2 2,4-D _L 2.7 Kn	S/R	1
Florimart	Pecíolos jóvenes	5.4 ANA 0.47 Kn	4.5 2,4-D 4.7 Kn	0.54 ANA 13.9 Kn	16
New Dwarf White	Pecíolos	2.2 2,4-D 2.7 Kn	22.6 2,4-D	S/R	30
New Dwarf White	Hipocótilo	2.2 2,4-D 2.7 Kn	0.25 2,4-D _L 2.7 Kn	S/R	2
Apio Chino	Pecíolos	2.2 2,4-D	2.2 2,4-D _L	2.8 Kn	147
Tall Utah 52-70 R	Yemas axilares	4.5 2,4-D 4.4 BA	2.2 2,4-D _L 0.46 Kn	2.3 2,4-D 4.5 Zeatina	100
Tendercrip	Hojas y pecíolos	6.8 2,4-D 2.7 Kn	6.8 2,4-D 2.7 Kn	S/R	11
New Dwarf White	N. R.	2.2 2,4-D 2.7 Kn	2.2 2,4-D 2.7 Kn	S/R	30
Tall Utah 52-70 R	Pecíolos	9.2 2,4-D 4.4 BA	0.45 - 2.7 2,4-D	S/R	37
Gaud-Beaup PI169001 y PI171500	Pecíolos jóvenes	2.2 2,4-D 2.7 Kn	0.4 BA	S/R	12
New Dwarf White	Pecíolos	2.2 2,4-D 2.7 Kn	2.2 2,4-D 2.7 Kn	varias hormonas	145

2,4-D - Acido 2,4-diclorofenoxiacético; Kn - Kinetina; BA - Bencilaminopurina; ANA - Acido naftalenacético; S/R - sin reguladores.

NOTA: En todos los casos se reportaron como medio (s) al propuesto por Murashige y Skoog (1962). Fuente: Vega (1987).

D. PROTEINAS DE RESERVA EN SEMILLAS.

Las proteínas presentes en el desarrollo embrionario son de dos tipos (Danielson, 1976; en Villegas, 1986):

- 1) Proteínas metabólicas: enzimáticas y estructurales, relacionadas con la actividad celular normal, incluyendo la síntesis del segundo tipo:
- 2) Proteínas de reserva, de acuerdo con Derbyshire (1976), pueden ser definidas como cualquier proteína acumulada en cantidades significativas durante el desarrollo embrionario y que durante la germinación son hidrolizadas rápidamente.

Las proteínas de reserva en la semilla, proporcionan nitrógeno y aminoácidos al embrión mientras viene a ser autótrofo, an tropocéntricamente son fuente de proteína en la dieta humana.

Por razones operacionales las proteínas de reserva pueden ser divididas en cuatro grupos de acuerdo a su solubilidad (Osborne et al., 1898; en Villegas, 1986): Albúminas, Globulinas, Prolaminas y Glutelinas, las cuales son solubles en agua, solu ción salina, solución alcohólica y soluciones ácidas o alcalinas, respectivamente.

Las semillas de cereales y leguminosas difieren en el tipo, cantidad y sitio de deposición de proteínas de reserva. En promedio las semillas de cereales contienen 10 % de proteína, mientras que en leguminosas el contenido varía entre 25 y 35 %. En cereales la fracción de proteínas prolaminas constituyen la mayor parte de las proteínas de reserva, en leguminosas lo es la fracción de globulinas. Las proteínas de reserva en cereales se localizan en el endospermo, en leguminosas en el embrión y coti

ledones.

En semillas de leguminosas, la fracción de proteínas de reserva globulinas, produce en gradientes de sacarosa dos grupos de proteínas con coeficientes de sedimentación de 6-8 S y 11-13 S con pesos moleculares de 150-200 Kd y 350 Kd, respectivamente y con puntos isoelectricos en un intervalo de pH de 4 a 6 (Ville gas, 1986). A partir de 1976 la fracción 6-8 S se le ha llamado Vicilina y a la de 11-13 S Legumina o simplemente proteínas - 7 S y 11 S, respectivamente.

La legumina (11 S), son proteínas hexaméricas, compuestas de seis subunidades (M = 60 Kd), cada una de las cuales consiste de un polipéptido relativamente ácido enlazado por puentes di sulfuro a un polipéptido básico (Lycett, 1984).

La vicilina (7 S), son proteínas menos definidas, con un peso molecular de 150,000, con subunidades de 50,000 Daltons.

Ambas globulinas se encuentran presentes en la familia Leguminosae y aún en otras plantas dicotiledóneas.

La síntesis de proteínas de reserva en leguminosas inicia con la endoreduplicación del genoma, durante el desarrollo embrionario y termina cuando la semilla va perdiendo humedad y entra al estado de latencia. Las proteínas 7 S y 11 S se depositan en cuerpos protéicos.

Aún cuando la relación en proteínas 11 S y 7 S no ha sido completamente estudiada, hay una gran similitud en la composición de aminoácidos de las proteínas vicilina y legumina entre diferentes especies leguminosas, lo que hace pensar que tienen ancestros genéticos comunes.

D.1. Proteínas embrio-específicas en embriogénesis somática.

Las proteínas de reserva han sido propuestas por Stuart et al. (1985), como un buen marcador bioquímico del proceso de embriogénesis somática en alfalfa, con el fin de obtener embriones somáticos de alta calidad.

Uno de los primeros estudios en donde se analizó la síntesis de proteínas de reserva en embriones somáticos, fue llevado a cabo por Crouch (1981, 1982), quien determinó el patrón de síntesis y acumulación de proteínas en embriones somáticos y cigóticos de Brassica napus, encontró dos proteínas de reserva embrioespecíficas; una glicoproteína 12 S y una proteína básica 1.7 S. Aunque ambas proteínas se encuentran presentes en embriones cigóticos y somáticos, el tiempo y extensión de acumulación son diferentes, siendo mucho menores en embriones somáticos.

En el sistema de embriogénesis somática de zanahoria Sung y Okimoto (1981), encontraron dos proteínas embrio-específicas, sin embargo su presencia no es constante y no obtuvieron suficientes evidencias para decir que el control interno de la embriogénesis es debido a cambios bioquímicos ocurridos antes de la determinación embriogénica de las células (el cambio de competencia a de terminación ocurre en zanahoria cuando se elimina la auxina del medio de cultivo).

En alfalfa, Stuart et al. (1985), demostraron que existe síntesis de proteínas de reserva en embriones somáticos, en el análisis de proteínas en geles de poliacrilamida, las bandas 7 S y 11 S corresponden a las encontradas en embriones cigóticos, asimismo, encontraron que una baja exposición y concentración de

2,4-D en el medio de inducción se traduce en una mayor síntesis de proteínas de reserva, en un mejor desarrollo de los embriones y en una mayor tasa de conversión. Concluyen que las proteínas de reserva pueden ser un buen marcador bioquímico para el diagnóstico de embriones con calidad y vigor.

Recientemente Stirn y Jacobsen (1987), analizan el patrón de proteínas de callos embriogénicos y no embriogénicos de chícharo, encontrando que son idénticos a excepción de dos polipéptidos (M = 45 Kd y 70 Kd, respectivamente), que se encontraron consistentemente en callos embriogénicos, aún cuando no hacen ninguna mención que estas proteínas se relacionen con proteínas de reserva.

En un estudio similar Chen y Luthe (1987), encuentran dos polipéptidos (M = 54 Kd y 24 Kd), presentes en callo embriogénico de arroz (Oryza sativa L.), pero ambos polipéptidos no fueron detectados en callo no embriogénico de la misma especie, en este estudio tampoco se hace comparación alguna con las proteínas de embriones cigóticos.

El estudio a nivel bioquímico de los eventos organizacionales y de desarrollo de la embriogénesis somática, seguramente podrá dar mayor información para el manejo y aplicación de la propagación clonal por cultivo de tejidos, sin embargo es de reconocer que hace falta una gran cantidad de estudios a este nivel para llegar a comprender los procesos de dediferenciación y rediferenciación de plantas in vitro.

tata L. y Laminaria saccharing (Windholz, 1975).

El alginato de sodio es insoluble en alcohol, cloroformo, éter y soluciones ácidas que tienen un pH menor de 3.

El alginato de sodio que es extraído del alga Laminaria hyperborea L., tiene una alta relación ácido gulourónico/ácido manurónico (G:M), por lo que al entrar en contacto con soluciones de sales de calcio, ocurre una reacción de intercambio iónico, formándose inmediatamente el gel de alginato de calcio, la consistencia del gel estará dada en base a la relación G:M y por los enlaces formados entre los grupos carboxílicos y moléculas de ácido gulourónico.

Algunos de los estudios donde se utiliza al alginato de sodio como agente inmovilizante o como matriz de encapsulación, son los siguientes:

Kierstan y Bucker (1977), han tenido éxito en la inmovilización de células de levadura (Saccharomyces cerevisiae y Kluyveromyces marxianus), enzimas (glucosa oxidasa) y organelos (-cloroplastos y mitocondrias), en alginato de calcio al 1 ó 2 %. Las células permanecieron vivas y con actividad metabólica para producir etanol hasta por 10 días, de igual modo mencionan que tanto enzimas como organelos manifiestan actividad metabólica.

Gisby y Hall (1980), inmovilizan cloroplastos en esferas de alginato de calcio, en presencia de un buffer biológico, ácido N-2 hidroxietilpipirizine-N-2 etanosulfónico (HEPES) a un pH de 7.5, más 1 % de albumina de suero bovino. Sus estudios de inmovilización de organelos son con el fin de realizar estudios metabólicos, en la producción de hidrógeno en organelos encapsulados.

El alginato puede estar combinado con otras sustancias, pa

ra proporcionar diferentes propiedades a la matriz de encapsulación. Kumaraswamy et al. (1981), reportan la inmovilización de enzimas en una matriz de ácido alginico y copolímeros de poliacrilamida, los grupos carboxilicos del ácido alginico y los grupos amida del copolímero proporcionan sitios de enlace para las enzimas, lo que les da una mayor estabilidad química.

Por su parte Franklin y Moss (1981), utilizan células y tejidos de rata, microencapsulan islotes pancreáticos y células hepáticas en alginato de calcio, además cubren a dichas cápsulas con una membrana semipermeable de polilisina, afirmando que las células encapsuladas mantienen su actividad, hasta por 24 días.

Matteau y Saddler (1982), encapsulan al hongo Trichoderma sp. en alginato de calcio, logrando producir glucosa en base a la asociación micelio-B-D-glucosidasa de Trichoderma. Encuentran que la vida media de la enzima es superior a las 1,000 horas. La enzima B-D-glucosidasa es esencial para la conversión enzimática de celulosa a glucosa.

Cheethan et al. (1982), trabajando con células de Erwinia rhapsontici, producen isomaltulosa a partir de soluciones concentradas de sacarosa, con células inmovilizadas en alginato de calcio.

Tipayang y Kosak (1982), producen cuentas gelificadas de alginato de calcio, conteniendo Lactobacillus vaccinostrerium (bacterias fermentadoras), los organismos encapsulados permanecen viables hasta por 30 días, proponen el método de encapsulación para producir ácido láctico.

Recientemente Kaya y Nelson (1985), proponen una nueva técnica para el control de insectos, la cual se basa en la encapsula-

ción de los nemátodos Steinernema feltiae y Heterohabditis heliothidis en alginato de calcio. Producen cápsulas con 300 nemátodos cada una, en estado infectivo, que utilizan para alimentar a insectos, con lo que esperan tener un método para implementarlo como control biológico de plagas.

Fravel et al. (1985), estudian el potencial del biocontrol de enfermedades vegetales, con organismos encapsulados en una matriz de arcilla-alginato, utilizan cloruro de calcio y gluconato de calcio para producir por intercambio iónico con alginato de sodio, una matriz de encapsulación. Encuentran que el gluconato de calcio produce un gel en donde significativamente hay una mayor sobrevivencia de organismos encapsulados, que si el intercambio iónico se realiza con cloruro de calcio.

E.2. Propiedades y usos de las pectinas.

En el presente estudio se utilizó al ácido poligalacturónico como uno de los geles para desarrollar la matriz de encapsulación de embriones somáticos obtenidos in vitro, a continuación se presentan algunas características generales de las pectinas.

Las pectinas son un amplio grupo de polisacáridos presentes en las plantas terrestres, se encuentran principalmente en frutos y en combinación con celulosa y almidón funcionan como componentes estructurales de la pared celular.

Las pectinas son muy conocidas por la propiedad que presentan de formar geles cuando se hacen reaccionar con azúcares y ácidos. Los polimeros de las pectinas están compuestos por unidades de ácido D-galacturónico en configuración piranosa, con enlaces glicosídicos α -1,4 (Glicksman, 1969). Los grupos carboxilo del ácido poligalacturónico pueden encontrarse: esterificados por grupos metilo, neutralizados con cationes o como ácidos libres; de acuerdo al grado de esterificación las pectinas se nombran de diferente forma (ácidos pectínicos, sustancias pécticas, pectinatos, etc.), pero todos son modificaciones del ácido poligalacturónico y se diferencian sólo por su grado de metilación.

Las propiedades de las sustancias pécticas dependen grandemente de su peso molecular o de su grado de metilación. Las pectinas industriales contienen un alto grado de metilación y gelifican con azúcares o ácidos, en cambio los ácidos poligalacturónicos con bajo grado de metilación tienen la propiedad de gelificar con iones de calcio, a menor grado de metilación hay una mayor cantidad de grupos carboxilo para reaccionar con iones de calcio (Towle y Christensen, 1973).

En el presente estudio se usará el término ácido poligalacturónico o pectinato para distinguirlo de las pectinas industriales.

La formación del gel de pectinato se lleva a cabo de manera similar a como se lleva en los alginatos, es decir funcionan como intercambiadores catiónicos altamente selectivos (Vijayalakshmi et al., 1979).

Para la gelificación del pectinato se requiere un pH ligeramente ácido o neutro, porque únicamente grupos carboxilos disociados toman parte en la reacción de entrecruzamiento.

Las pectinas son ampliamente utilizadas en la fabricación de conservas y jaleas.

Aún cuando los pectinatos tienen una composición y estructura similar a los alginatos, han sido poco utilizados para estudios de inmovilización de material biológico. En uno de los pocos reportes donde se utiliza el pectinato como matriz de encapsulación Vijayalashmi et al. (1979), reportan que en la encapsulación de células de levadura el pectinato permanece estable en un intervalo de pH de 2 a 11, el tamaño de las esferas puede ser bien controlado en un intervalo de 200 a 400 μ , prácticamente no tuvieron problemas de contaminación y las células inmovilizadas mantuvieron su viabilidad y estabilidad por más tiempo que si no estuvieran encapsuladas.

Recientemente Arjona y Magaña (1987), utilizan pectinato al 5.0 %, para inmovilizar células que hidrolizan el almidón de la harina del barbasco, indican que el pectinato puede funcionar mejor como matriz de encapsulación que el alginato mismo, en la inmovilización de las células mencionadas.

F. ENCAPSULACION DE EMBRIONES SOMATICOS.

La propagación clonal masiva in vitro de plantas superiores a nivel comercial es un objetivo que en estos momentos avisan diferentes investigadores.

La posibilidad de producir un gran número de plantas clonadas es una alternativa que ofrece el proceso de embriogénesis somática.

A la fecha gran cantidad de reportes de regeneración in vitro por embriogénesis somática, indican que probablemente cualquier especie vegetal puede regenerarse por esta vía, aún especies que hasta hace poco eran consideradas como recalcitrantes, como es el caso de los cultivos más importantes a nivel mundial: trigo, arroz y maíz.

Ha habido poco uso comercial del cultivo de tejidos vegetales, los métodos de propagación por cultivo in vitro únicamente son aplicados a especies ornamentales y horticolas con un alto valor unitario.

El escalamiento de la producción de plantas in vitro es posible si se desarrollan sistemas de cultivo altamente eficientes y en forma mecanizada (Murashige, 1978; Lutz et al., 1985), para competir económicamente con los métodos de propagación por semilla. Una vez que un sistema de embriogénesis somática es bien establecido, es necesario utilizar métodos de fácil y económico manejo de los embriones producidos.

Se han propuesto diferentes metodologías para propagar masivamente a embriones somáticos: Encapsulación de embriones somáticos (Redenbaugh et al., 1984); Suspensión en gel, en un proce

so llamado "fluid drilling" (Sharp et al., 1980; Lutz et al., 1985) y secado de embriones somáticos (Villegas, 1988; comunicación personal).

A la fecha los mayores avances han sido hechos en encapsulación de embriones somáticos, por un grupo de investigación de Plant Genetics Inc., dirigidos por Keith Redenbaugh.

El objetivo de encapsular embriones somáticos es proporcionarles una cubierta "bastante flexible para amortiguar y proteger al embrión, que permita su germinación y sin embargo lo suficientemente rígida para soportar el rudo manejo de las cápsulas durante su fabricación, transporte y plantación" (Redenbaugh et al., 1986)

Para producir un análogo de una semilla de origen sexual - (un embrión somático encapsulado), se toma como base la similitud que existe con los embriones cigóticos en morfología, fisiología y bioquímica (Redenbaugh et al., 1986a).

Los embriones somáticos obtenidos in vitro, siguen durante su desarrollo, las mismas etapas morfológicas que en la embriogénesis sexual (Dos Santos et al., 1983; Sung et al., 1984; Ammirato, 1987). A nivel histológico las células que disparan la embriogénesis somática, tienen grandes semejanzas citológicas y morfológicas con células sexuales embrionarias y meristemáticas; núcleos prominentes, poco vacuoladas, ricas en citoplasma, etc. (Sharp et al., 1980). A nivel bioquímico Crouch (1982), demostró que en embriones somáticos de Brassica napus hay síntesis de proteínas de reserva (12 S y 1.7 S), mismas que son características y específicas del desarrollo embrionario sexual. En Me dicago sativa L. Stuart et al. (1985), llegan al mismo resulta-

do, sólo que las proteínas de reserva son la 7 S y 11 S.

Para producir semillas artificiales se debe desarrollar una matriz de encapsulación que sea capaz de contener y liberar nutrientes, reguladores del crecimiento y otros compuestos necesarios para la conversión del embrión en plántula. Idealmente la cápsula podría contener sustancias y microorganismos para cultivos y condiciones ambientales específicas. Además el embrión encapsulado podría ser manejado y plantado usando los equipos de siembra de semillas sexuales.

Se necesita investigación en diferentes áreas: sincronización del desarrollo de embriones somáticos y producción de embriones somáticos en biorreactor, para lograr el escalamiento de semillas artificiales. En zanahoria la sincronización de embriones somáticos es obtenida por diferentes métodos y en diferentes etapas. Fujimura y Komamine (1979), obtienen únicamente poblaciones de embriones globulares por filtración y tratamiento con zeatina 10^{-7} M, aunque el desarrollo posterior es asincrónico. - Lutz et al. (1985), obtienen hasta 70 % de embriones en estado torpedado por separación en gradientes de Percoll, filtración y tratamientos con ácido abscísico 10^{-6} M. Giuliano et al. (1983), obtienen embriones en etapa corazón y torpedo por filtración en mallas de 170 μ . Por otra parte la producción de embriones somáticos en biorreactor ya es posible en zanahoria y probablemente en un futuro cercano en otros cultivos (Styer, 1985).

Kitto y Janick (1980), iniciaron trabajos para utilizar diferentes compuestos como cubiertas artificiales de embriones, en sus primeros estudios utilizaron embriones sexuales de cítricos a los que les sustituyeron sus cubiertas naturales, por una arti

ficial; continuando con sus investigaciones Kitto y Janick (1981 y 1985a), reportan diferentes compuestos que utilizan como cubiertas artificiales en embriones somáticos de zanahoria, encuentran que Polyox WSR-N, Viscalex HV30 y Laponite XLS, son los compuestos más adecuados para usarse como cubierta artificial. De estos tres compuestos, Polyox WSR-N (óxido de polietileno), arrojó los mejores resultados y es el más utilizado en investigaciones posteriores, para 1982 los mismos autores encuentran que embriones somáticos de zanahoria encapsulados, permanecen viables después de ser cubiertos con Polyox al 2.5 % y secados durante 6 horas.

Kitto y Janick (1983), determinan la sobrevivencia de embriones somáticos de zanahoria encapsulados con Polyox WSR-N, al someterlos a tratamientos con frío (4 °C) y ácido abscísico (10^{-6} M), durante los tres últimos días de inducción, encontraron que estos tratamientos favorecían la sobrevivencia de embriones encapsulados sobre los testigos sin tratamiento. También encontraron que el tamaño del embrión es determinante en los porcentajes de conversión, de tres tamaños probados (0.2, 0.4 y 0.6 mm), la mejor respuesta para desarrollar plántulas a partir de embriones encapsulados, fue con los de mayor tamaño. Sin embargo, Kitto y Janick (1985), combinan tratamientos tales como: altas concentraciones de sacarosa, frío, ABA y diferentes densidades de inoculo, y observan que hay disminución en la viabilidad de los embriones encapsulados (Kitto y Janick, 1985b).

Un problema importante en los estudios de Kitto y Janick, es que la cubierta de encapsulación utilizada, tiene un espesor muy pequeño, por lo que los embriones a pesar de estar protegidos contra cambios ambientales, tienen el inconveniente de que

se dañan fácilmente y su manejo sería muy delicado, por lo que el uso del óxido de polietileno como matriz de encapsulación, es difícil de implementar a nivel comercial.

Redenbaugh et al. (1986a), utilizan diferentes hidrogeles naturales para encapsular embriones somáticos, encuentran que el alginato de calcio es un gel adecuado para encapsular embriones somáticos de alfalfa, coliflor y apio. El alginato no presenta toxicidad para el embrión, es soluble a temperatura ambiente, no requiere calor para gelificar y presenta una consistencia adecuada para su manejo en forma de pequeñas cuentas esféricas (Knorr et al., 1984; Redenbaugh et al., 1984).

Los embriones somáticos obtenidos por Redenbaugh y col., son encapsulados con alginato de sodio al 3.2 %. La frecuencia de conversión de embriones encapsulados a plántulas, fue de 30 a 40 % en embriones de alfalfa y de 60 a 90 % en embriones de apio, cuando son colocados para su germinación en substratos de agar; en cambio cuando el substrato fue vermiculita, arena o turba, hubo una baja frecuencia de conversión a plántulas (5 %), sin embargo demostraron la factibilidad de sembrar a los embriones encapsulados directamente en invernadero.

Recientemente, Redenbaugh et al. (1987), continuando con sus estudios de encapsulación de embriones somáticos de alfalfa, encuentran que substituyendo la fuente de carbono por maltosa en el medio de germinación, aumenta el porcentaje de conversión de embriones encapsulados a casi el 50 %.

Con respecto a otras metodologías para lograr la producción de grandes cantidades de plantas por embriogénesis somática, Drew (1979), propone adaptar la tecnología de siembra mecanizada de semillas pregerminadas ("Fluid drilling"), para liberar grandes can

tidades de embriones somáticos en invernadero o campo.

La siembra de semillas pregerminadas, proporciona: germinación más uniforme, menor tiempo de emergencia en condiciones de campo adversas y precisión y eficiencia en la siembra de semillas sexuales (Lutz et al., 1985). El proceso consiste en suspender a las semillas en un gel portador suplementado con aditivos, las cuales son bombeadas a suelo.

El problema de este sistema de propagación en el caso de zanahoria es que sus embriones somáticos son demasiado pequeños para manejarlos y se necesita condiciones de esterilidad y alta humedad por un largo período, mientras los embriones vienen a ser autotróficos (Drew, 1979).

Otra metodología tendiente a la propagación masiva de plantas por embriogénesis somática es secando gradualmente a los embriones somáticos, con lo que las actividades metabólicas se reducirían al mínimo y el embrión entraría a un estado de latencia forzado. La idea proviene del grupo de D.C.W. Brown de la universidad de Ottawa, y fue propuesta en contraposición al proceso de encapsulación que se lleva a cabo en condiciones de alta humedad.

Las semillas de origen cigótico pasan de un estado de alta humedad a uno de desecación o baja humedad en poco tiempo, durante este proceso la semilla sufre una gran cantidad de cambios fisiológicos que tienen como fin alcanzar el estado de latencia - (Tran y Cavanagh, 1984).

La idea de Brown y col., quizá tiene el problema de nuestro pobre conocimiento de los procesos de inducción, mantenimiento y rompimiento de latencia en semillas sexuales para extrapolar conclusiones a embriones somáticos.

F.1. Potencial de semillas artificiales.

Los avances logrados en embriogénesis somática permiten prever que diferentes grupos interesados en desarrollar la tecnología de producción de semillas artificiales, competirán para alcanzar la supremacía en el campo, lo que seguramente traerá problemas a grupos o países que tardan en enfocar su apoyo a este tipo de tecnologías. Un ejemplo palpable son las patentes, en el caso de semillas artificiales, Redenbaugh et al. (1987), obtuvieron la patente y consecuentemente poca o vaga información será obtenida durante un tiempo considerable.

La producción de semillas artificiales proporcionará sistemas de rápida propagación clonal, en donde se combinen las ventajas de la propagación vegetativa (incremento en la producción, uniformidad en las cosechas y resistencia a enfermedades), con los bajos costos de los sistemas de producción de semillas verdaderas (Redenbaugh et al., 1986).

Los usos potenciales de semillas somáticas son dobles: como sistema de producción y como instrumento analítico. Las semillas artificiales ofrecen la posibilidad de desarrollar sistemas de propagación masiva a bajo costo que puedan competir con semillas verdaderas. La tecnología probablemente será utilizada primero en cultivos con alto valor unitario; ornamentales y hortalizas y posteriormente en monocultivos.

Como instrumento analítico las semillas artificiales podrían ser una ayuda en estudios de embriogénesis; determinación del papel del endospermo en el desarrollo y germinación del embrión, estudios de formación de cubiertas de semilla y en variación somaclonal (Redenbaugh et al., 1987).

La tecnología de producción de semillas artificiales una vez probada en una especie, podrá con sus modificaciones, ser adaptada a cualquier sistema de embriogénesis somática.

La industria de semillas será radicalmente cambiada a medida que se optimicen los procesos de propagación in vitro.

Actualmente la experiencia muestra la posibilidad de disminuir costos de producción si la conducta del cultivo in vitro es ta bien conocida y optimizada (Boxus y Druart, 1980).

El costo de semillas artificiales (basado en el sistema de alfalfa), fue calculado en 261.36 dólares por millón de unidades ó 0.026 centavos por unidad (Redenbaugh et al., 1987). Este costo incluye todo el proceso de cultivo de tejidos, encapsulación y gastos generales, y ha probado ser menor que en algunas especies híbridas y ornamentales. Las semillas de begonia, geranio híbrido, gerbera y petunia tienen un costo unitario de 0.3, - 6.0, 1.4 y 0.35 centavos de dólar.

Redenbaugh et al. (1987), enlistan 10 etapas para la comercialización de semillas artificiales: 1) seleccionar un cultivo - en base a su potencial biotecnológico y comercial, 2) desarrollar el sistema de embriogénesis somática, 3) optimizar el sistema, incluyendo la conversión de embriones somáticos, 4) automatizar la producción (uso de biorreactores), 5) sincronizar las etapas de desarrollo de los cultivos, 6) detener el desarrollo de los embriones en etapas específicas, 7) desarrollar la matriz de encapsulación, 9) identificar plagas y enfermedades específicas de semillas artificiales y 10) evaluar la producción agronómica de plantas provenientes de semillas artificiales.

G. PELETIZADO DE SEMILLAS.

El peletizado de semillas consiste en que unidades de semilla o semillas son recubiertas con algún material que les cambia el tamaño, forma y peso original, las semillas pueden ser recubiertas parcial o totalmente (Moreno, 1984).

Es importante conocer aspectos de peletización si consideramos que con la producción de semillas artificiales, sería posible utilizar estos sistemas de producción (con sus ventajas), y así lograr una más fácil aceptación de los agricultores, por embriones somáticos encapsulados.

Las semillas cubiertas y con una forma determinada, presentan varias ventajas sobre las semillas naturales, como lo son: precisión en la plantación de semillas pequeñas y de forma irregular, reducción de costos en operaciones manuales, inclusión de substancias químicas benéficas para la semilla, uso de menor cantidad de semillas, uniformidad en el microambiente de la semilla y la implementación de una alta mecanización en los cultivos (Roos y Moore, 1975; Hasley y White, 1980).

El peletizado es utilizado ampliamente en la producción de semillas de cultivos ornamentales y hortícolas (Sachs et al., 1981; Sachs et al., 1982).

Una semilla peletizada aumenta la mecanización, con los sistemas de producción existentes, es posible colocar a la semilla en un espacio y profundidad determinada (Miller, 1971; Miller y Bensin, 1974), con lo que se logra una mayor uniformidad en los cultivos y en ocasiones una mayor producción.

Sin embargo, las cubiertas proporcionadas a las semillas -

(arcilla, arena, carbón activado, polímeros, etc.). muchas veces limitan la eficiencia de la germinación y emergencia de las semillas (Sharples, 1981), o en otros casos la velocidad de germinación se ve disminuída (Chrimes y Gray, 1982). Reportes recientes sugieren que la falta de un buen aprovisionamiento de oxígeno y/o agua, son responsables de la poca germinación de semillas peletizadas (Miller, 1971), por lo que se han hecho diversos estudios (Sharples, 1978; Sharples y Gentry, 1980; Sachs et al., 1981), para encontrar materiales que no limiten la germinación y emergencia de las semillas.

De los diferentes materiales utilizados como cubierta, el carbón activado y la arenilla, han dado buenos resultados en el peletizado de semillas (Sharples et al., 1980). El carbón activado adsorbe una sustancia inhibitoria de la germinación, de acuerdo con Sharples (1978), esta (s) sustancia es producida por la misma semilla, por su parte la arenilla permite un adecuado intercambio de oxígeno entre la semilla y su microambiente (Sachs et al., 1982).

La cubierta de las semillas, puede darles forma de tabletas, pero lo importante es utilizar materiales que favorezcan la germinación y desarrollo de las semillas. Una alternativa es proporcionar a la semilla diferentes sustancias como: herbicidas, fertilizantes, reguladores del crecimiento, microorganismos, etc. con lo que se tendría mayor seguridad de que a partir de una semilla se obtendrá una planta. En el caso de embriones somáticos encapsulados, se puede optar por la misma alternativa, para producir en lo posible a un verdadero análogo de una semilla de origen sexual.

IV. MATERIALES Y METODOS.

A. MATERIAL VEGETATIVO.

En el presente estudio se trabajó con semillas de alfalfa (Medicago sativa L.), variedad Rangelandier línea A 70.34 proporcionadas por el Plant Research Center de agricultura de Canadá, con plántulas de alfalfa (Medicago falcata) línea Fl.1 provenientes del mismo centro de investigación y con semillas de apio (Apium graveolens L.), variedad Dulce Mill Pers. tipo Tall Utah 52-70 (semillas marca ITSCO), importadas de Estados Unidos.

B. CULTIVO IN VITRO.

B.1. Preparación de medios y condiciones de cultivo.

Los medios basales utilizados en la presente investigación fueron: MS (Murashige y Skoog, 1962), MS modificado (en contenido de nitrógeno por Meijer y Brown, 1987), SH (Schenk y Hildebrandt, 1972) y B₅e (Villegas y Brown, 1987, modificado de Gamborg et al., 1968), la composición de cada medio se indica en el apéndice.

El pH de los medios de cultivo se ajustó previamente a la esterilización: el MS, MS modificado y SH a 5.8 ± 0.1 y el B₅e a 5.5 ± 0.1 con NaOH o HCl 1.0 N. La esterilización de los medios fue realizada a 15-17 lbs/pulg² de presión y 121 °C de temperatura durante 20 minutos.

La incubación de los cultivos fue lograda en un fotoperíodo de luz-obscuridad de 16/8, a una temperatura de 27 ± 3 °C; la iluminación fue proporcionada por 6 lámparas fluorescentes de 39 watts (marca Philips), colocadas a 150 cm de distancia de los frascos de cultivo.

El manejo del material vegetativo se realizó dentro de una cámara de flujo laminar de aire filtrado marca Veco unidad GHFI-Al2 y se trabajó con material esterilizado y/o flameado en alcohol.

B.2. Obtención de material aséptico.

La desinfección superficial de las semillas de apio y alfalfa A 70.34 consistió en sumergirlas en etanol absoluto durante 1 minuto, inmediatamente después se colgaron en solución de cloro comercial al 30% durante 5 minutos (con agitación constante), posteriormente para eliminar los agentes desinfectantes se lavaron las semillas con agua esterilizada y se dejaron 24 horas inmersas en agua. Al cabo de este período se trataron una vez más con cloro comercial al 30% durante 5 minutos y se lavaron 3 veces con agua (Vega, 1987).

Las semillas ya desinfectadas se sembraron en frascos gerber o magentas de 70 x 70 x 100 mm, con 20 y 60 ml respectivamente de medio de cultivo basal SH o MS al 50%, suplementado con 10 g/l de sacarosa y 8 g/l de Bacto agar. En cada recipiente se sembraron de 15 a 20 semillas de alfalfa o de 40 a 50 de apio.

La incubación de semillas de alfalfa A 70.34 fue primero 24 horas en obscuridad y posterior traspaso a las condiciones de fo

toperíodo y temperatura ya descritas. Para semillas de apio la incubación fue en luz continua a la temperatura mencionada (Vega, 1987).

En el caso de plántulas de alfalfa Fl.1 ya se tenían en condiciones asépticas y sólo se propagaron por entrenudos.

C. EMBRIOGENESIS SOMÁTICA.

A continuación se describen los protocolos empleados para la obtención de embriones somáticos y plántulas, desarrollados originalmente por Villegas (1986), Meijer y Brown (1987) y Vega, (1987), para alfalfa A 70.34, Fl.1 y apio, respectivamente, - se separan las fases de inducción, desarrollo y conversión o germinación.

C.1. Inducción y Desarrollo.

Tanto en alfalfa A 70.34 como en Fl.1, se utilizó como fuente de inóculo a pecíolos de plántulas de más de 45 días de edad, se colocaron de 5 a 7 fracciones de pecíolos de 5-8 mm en cajas de petri de 60 x 15 mm y frascos de vidrio de 50 x 30 mm con 7-8 ml de medio de cultivo. En alfalfa A 70.34 los pecíolos se sembraron en medio B₅e, suplementado con 1 mg/l de 2,4-D, 0.2 mg/l de Kn, 30 g/l de sacarosa y 9 g/l de Bacto agar, con un tiempo - de incubación de 40 a 45 días (Villegas, 1986), lo que incluye las etapas de inducción y desarrollo, que posteriormente fueron separadas.

En alfalfa Fl.1 se sembraron pecíolos en medio MS modifica-

do, suplementado con 5 mg/l de 2,4-D, 1 mg/l de Kn, 30 g/l de sa carosa y 8 g/l de Bacto agar, durante 12-15 días (Meijer y Brown, 1987).

El desarrollo de embriones somáticos de alfalfa Fl.1 se lle vó a cabo transfiriendo callos, provenientes de pecíolos, de 12 a 15 días de edad, al medio MS modificado sin reguladores del crecimiento y suplementado con 30 g/l de sacarosa y 8 g/l de Bacto agar (Meijer y Brown, 1987). Los cultivos son incubados por 20-25 días, después de este tiempo se rescatan los embriones.

Durante la siembra de alfalfa A 70.34 y Fl.1, los internodos de plantas embriogénicas fueron seleccionados y sembrados en medio MS al 50 % sin reguladores del crecimiento, para su clonación (proceso de selección recurrente).

En apio la fuente de inóculo fueron hojas cotiledonares provenientes de plántulas germinadas in vitro de 18-20 días de edad, se sembraron 15-18 hojas cotiledonares por frasco gerber con 20 ml de medio SH, al que se le sustituyeron los micronutrientes por los del MS, suplementado con 0.5 mg/l de 2,4-D, 30 g/l de sa carosa y 8 g/l de Bacto agar, durante 45 días (Vega, 1987), lo que incluye las etapas de inducción y desarrollo.

G.2. Germinación de embriones somáticos.

Los embriones somáticos de alfalfa A 70.34 de 40-45 días (desde la siembra del inóculo), con un tamaño entre 2 y 4 mm y en estado torpedo, fueron puestos a germinar en frascos gerber con 20 ml de medio SH, suplementado con 0.02 mg/l de AIA, 10 g/l de sacarosa y 8 g/l de Bacto agar (Villegas, 1986). En alfal-

fa Fl.1 la germinación de embriones somáticos se obtiene en medio MS al 50%, suplementado con 15 g/l de sacarosa y 8 g/l de Bacto agar. En cada frasco se colocan de 15 a 20 embriones somáticos - con un tamaño entre 2 y 4 mm y en estado torpedado, se evalúa la germinación después de 30 días (Villedas, 1986).

El medio de germinación de embriones somáticos de apio fue el MS, suplementado con 0.1 mg/l de Kn, 30 g/l de sacarosa y 8 g/l de Bacto agar (Vega, 1987). Se colocaron de 15 a 20 embriones somáticos con un tamaño entre 2 y 5 mm y en estado torpedado, en cada frasco gerber con 20 ml de medio, después de 30 días de sembrados los embriones se evalúa germinación.

D. MANIPULACIONES REALIZADAS EN MEDIO Y CONDICIONES DE CULTIVO, PARA OBTENER EMBRIONES SOMÁTICOS DE ALTA CALIDAD.

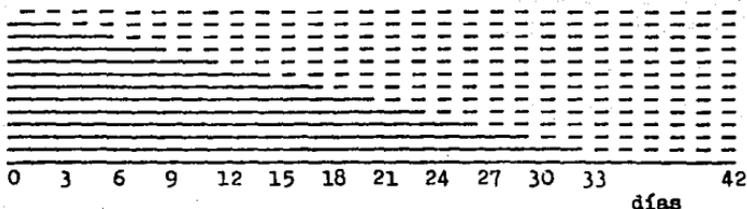
D.1. Separación de las fases de inducción y desarrollo de embriones somáticos de alfalfa A 70.34 y apio tipo - Tall Utah 52-70.

Con objeto de mejorar las respuestas y rendimientos obtenidos con los protocolos de embriogénesis originales, hubo necesidad de hacer experimentos tratando de optimizar algunas condiciones de cultivo, para obtener embriones somáticos de alta calidad.

En primer lugar se intentó separar las fases de inducción y desarrollo, del proceso embriogénico de alfalfa A 70.34 y apio. Para esto, se sembraron 300 pecíolos de alfalfa A 70.34 en el medio de inducción (B₅e con 1 mg/l de 2,4-D, 0.2 mg/l de Kn, 30 -

g/l de sacarosa y 9 g/l de bacto agar) y se siguió la siguiente secuencia de trasplante:

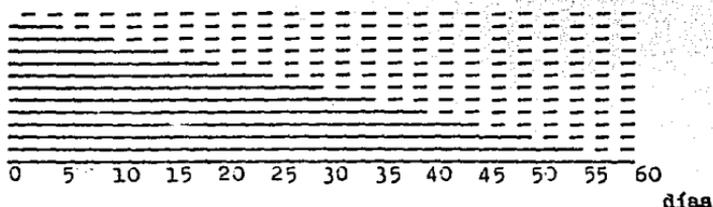
Inducción (——) → (---) Desarrollo



a medio de desarrollo (B_5 sin reguladores, suplementado con 30 g/l de sacarosa y 9 g/l de bacto agar), tomando de 25 a 30 unidades experimentales por cada trasplante de medio de inducción a medio de desarrollo. Al término del desarrollo (días 40-42), se evaluó: la respuesta (número de inóculos con embriones/número de inóculos), el rendimiento (promedio del número de embriones/inóculo) y el contenido de proteínas de los embriones somáticos (ver análisis de proteínas), para cada uno de los diferentes tiempos de trasplante.

En apio se sembraron 600-700 hojas cotiledonares distribuidas (16-20), en 36 frascos gerber, cada uno con 20 ml de medio de inducción (SH con los microminerales del MS, con 0.5 mg/l de 2,4-D, 30 g/l de sacarosa y 8 g/l de bacto agar) y se siguió la siguiente secuencia de trasplante:

Inducción (——) — (---) Desarrollo



a medio de desarrollo (MS suplementado con 0.1 mg/l de Kn, 30 g/l de sacarosa y 8 g/l de Bacto agar), tomando en cada trasplante los callos de hojas cotiledonares de 3 frascos gerber. Después de 60 días se evaluó la producción de embriones somáticos - por frasco, para cada uno de los diferentes tiempos de transplante.

En alfalfa Fl.1 Meijer y Brown (1987), han logrado separar las fases de inducción y desarrollo en esta línea.

D.2. Efecto de casaminoácidos en el desarrollo de embriones somáticos de alfalfa A 70.34.

Diferentes autores (Stuart et al., 1985; Meijer y Brown, 1987), han reportado aumento en la calidad y producción de embriones somáticos de alfalfa, por adición de aminoácidos a los medios de cultivo. Con el fin de determinar la concentración óptima de casaminoácidos en el medio de desarrollo, para aumentar el rendimiento de embriones somáticos de alfalfa A 70.34 y al mismo tiempo obtener mayores porcentajes de germinación y plántulas con mayor vigor, se sembraron 180 pecíolos de alfalfa A 70.34 en medio de inducción, después de 13 días se transfirieron -

25-30 callos de pecíolos a cada uno de los siguientes tratamientos: 0.0 (testigo), 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 5.0 g/l de casaminoácidos en el medio de desarrollo (B₅ sin reguladores con 30 g/l de sacarosa y 9 g/l de bacto agar). Cada 4 días a partir del día 8 de estar los inóculos en el medio de desarrollo, se evaluó; el número de embriones en estado globular, corazón y torpedo con ayuda de un microscopio estereoscópico, y finalmente en el momento del rescate de los embriones (trasplante a medio de germinación), se hizo la evaluación del rendimiento, la respuesta, etapas de desarrollo y porcentaje de germinación de los embriones somáticos.

D.3. Efecto de casaminoácidos en la inducción de embriones somáticos de alfalfa A 70.34.

Para observar si la mejor concentración de aminoácidos de terminada para el desarrollo de embriones somáticos de alfalfa A 70.34, tenía algún efecto en la fase de inducción, se realizó el siguiente experimento:

Inóculos sembrados	Tratamiento	
	Inducción (15 días)	Desarrollo (27 días)
56	Sin casaminoácidos	Sin casaminoácidos
56	Sin casaminoácidos	1.75 g/l casaminoác.
56	1.75 g/l casaminoác.	1.75 g/l casaminoác.
32	1.75 g/l casaminoác.	Sin casaminoácidos

Se evaluó la respuesta, el rendimiento, calidad y germinación de los embriones somáticos en cada uno de los tratamientos.

D.4. Efecto del ácido abscísico (ABA), en el desarrollo de embriones somáticos de alfalfa A 70.34.

El desarrollo de sincronía es uno de los principales problemas en embriogénesis somática (Lutz et al., 1985), la asincronía de los cultivos limita no sólo la aplicación biotecnológica de esta forma de propagación clonal, sino también su estudio básico. Por un lado la selección de embriones maduros en una población de embriones compuesta por diferentes etapas de desarrollo, aumenta los costos de producción, por el gran trabajo manual requerido y por otro lado, el estudio a nivel bioquímico de alguna etapa de desarrollo, puede verse enmascarado por la presencia de embriones en otras etapas. Con el fin de aumentar la sincronía de embriones somáticos de alfalfa A 70.34, se realizó el siguiente experimento:

Se sembraron 180 pecíolos de alfalfa A 70.34 en medio de inducción, después de 13 días se transfirieron 25-30 callos de pecíolos a cada uno de los siguientes tratamientos: 0.0 (testigo), 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 y 10.0 mg/l de ABA en el medio de desarrollo (B₅ sin reguladores con 30 g/l de sacarosa y 9 g/l de bacto agar). Cada 4 días a partir del día 8 de estar los callos en el medio de desarrollo se evaluó: el número de embriones en esta do globular, corazón y torpedo con ayuda de un microscopio estereoscopio, y finalmente en el momento del rescate de los embriones (trasplante a medio de germinación), se hizo la evaluación del rendimiento, la respuesta, etapas de desarrollo y porcentaje

de germinación de embriones somáticos.

D.5. Germinación de embriones somáticos de alfalfa A 70.34.

Con el protocolo original de germinación de embriones somáticos propuesto por Villegas (1986), se obtuvo un porcentaje de germinación de alrededor del 10 %, para mejorar los porcentajes de conversión, se probaron los siguientes diseños experimentales:

D.5.1. Germinación de embriones somáticos de alfalfa A 70.34 en 3 medios basales a 3 concentraciones.

Medio basal	Concentración (%)		
	100	50	25
MS	+	+	+
B ₅ e	+	+	+
SH	+	+	+

Del experimento anterior, se obtuvo el mejor porcentaje de germinación con el medio MS basal al 50 %. Utilizando este medio se probó el efecto de diferentes reguladores del crecimiento en la germinación de embriones somáticos de alfalfa A 70.34, de acuerdo al siguiente diseño experimental:

D.5.2. Germinación de embriones somáticos de alfalfa A 70.34, en presencia de diferentes reguladores del crecimiento a diferentes concentraciones.

Regulador del crecimiento	Concentración (mg/l)		
	0.01	0.1	1.0
Acido indolacético (AIA)	+	+	+
Acido indolbutírico (AIB)	+	+	+
6-Bencil-aminopurina (BAP)	+	+	+
Acido giberélico (GA ₃)	+	+	+

Se colocaron en cada tratamiento un mínimo de 90 y 60 embriones somáticos (experimentos D.5.1. y D.5.2., respectivamente), en estado torpedo, distribuidos de 15 a 20 embriones por frasco gerber con 20 ml de medio de germinación, de acuerdo al experimento y tratamiento en cuestión. Transcurridos 30 días de incubación, se evaluó el porcentaje de germinación de cada tratamiento.

E. EFECTO DE DIFERENTES TIPOS DE "STRESS" DURANTE EL DESARROLLO DE EMBRIONES SOMATICOS DE ALFALFA A 70.34 Y Fl.1.

Con objeto de tratar de emular algunas condiciones que sufren los embriones sexuales dentro de la semilla, antes de entrar en latencia, en los embriones somáticos desarrollados in vitro, se aplicaron diferentes tipos de "stress" durante el desarrollo de los embriones somáticos de alfalfa A 70.34 y Fl.1, de acuerdo al siguiente procedimiento experimental:

270 pecíolos de alfalfa A 70.34 y 240 de Fl.1, fueron sembrados en sus respectivos medios de inducción, después de 15 días,

30 callos de pecíolos fueron transferidos a cada uno de los siguientes tratamientos, aplicados en el medio de desarrollo:

Tratamiento	Variedad		Efecto
	A 70.34	Fl.1	
I	Sin reguladores	Sin reguladores	Testigo
II	Con reguladores	Con reguladores	Desarrollo en <u>con</u> tinua presencia de reguladores.
III	ABA 0.5 mg/l	ABA 0.5 mg/l	Sincronización e inhibición de germinación.
IV	Sacarosa 10 g/l Manitol 20 g/l	Sacarosa 10 g/l Manitol 20 g/l	Disminución de la fuente de carbono metabolizable.
V	Polietylenglicol 1000 al 10 %	Polietylenglicol 1000 al 10 %	"stress" hídrico.
VI	Obscuridad	Obscuridad	Evitar el efecto del fotoperíodo.
VII	Tratamientos III a VI juntos	Tratamientos III a VI juntos	Combinar efectos.

En alfalfa A 70.34, a partir del día 15 de haberse transferido los inóculos a los diferentes tipos de "stress", se evaluó - cada 5 días; el número de embriones en estado globular, corazón y torpedo en el microscopio estereoscópico. Para alfalfa Fl.1 la misma evaluación se hizo cada 4 días a partir del día 5 de la -- transferencia de los inóculos al medio de desarrollo con condicio nes de "stress".

El rescate de los embriones somáticos se realizó para la A 70.34 en el día 30 de estar en el medio de desarrollo y para la Fl.1 en el día 17, previamente se evaluaron: respuesta, rendimiento y número de embriones en estado globular, corazón y torpedo.

Con los embriones somáticos de alfalfa A 70.34 y Fl.1 se realizaron estudios de germinación y el análisis de proteínas de reserva.

F. ANALISIS DE LAS PROTEINAS DE RESERVA 7 S y 11 S.

Con el objetivo de tener un marcador bioquímico que determinara las condiciones in vitro necesarias para obtener embriones somáticos de alta calidad en alfalfa, se seleccionó a las proteínas de reserva 7 S y 11 S, para tal fin. Los procedimientos de extracción de proteínas, cuantificación y caracterización se describen a continuación:

F.1. Extracción de proteínas de semillas de alfalfa A 70.34 y de embriones somáticos de alfalfa A 70.34 y Fl.1

La extracción de proteínas de semillas de alfalfa A 70.34, callos y embriones somáticos de A 70.34 y Fl.1, se llevó a cabo aprovechando las características de solubilidad de los diferentes tipos de proteínas: Albúminas extraídas con buffer simple, Globulinas que se extraen en buffer salino, Prolaminas en buffer alcohólico y Glutelinas solubles en álcali o ácido diluidos (Villegas, 1986). En todas las soluciones de extracción se utili-

zó buffer de fosfatos pH 7 e inhibidores de proteasas (PMSF, - EDTA, etc.).

Las soluciones buffer empleadas en la extracción y separación de proteínas de reserva, se resume en el siguiente cuadro:

<u>Buffer</u> ^a	<u>Composición</u>
I	Fosfatos 50 mM, PMSF 200 μ M y EDTA 10 mM
II	Fosfatos 50 mM, PMSF 200 μ M, EDTA 10 mM, DTT 10 mM y NaCl 1 M.
III	Fosfatos 50 mM, PMSF 200 μ M, EDTA 10 mM, en propanol al 70 %.
IV	Fosfatos 50 mM, PMSF 200 μ M, EDTA 10 mM y NaOH 0.1 N.
V	Acetatos 50 mM, PMSF 200 μ M, EDTA 10 mM y NaCl 1 N.

PMSF - Fenilmetil sulfonil fluoruro

EDTA - Etilen dimetil tetracetato de sodio (sal disódica)

DTT - Ditiotreititol

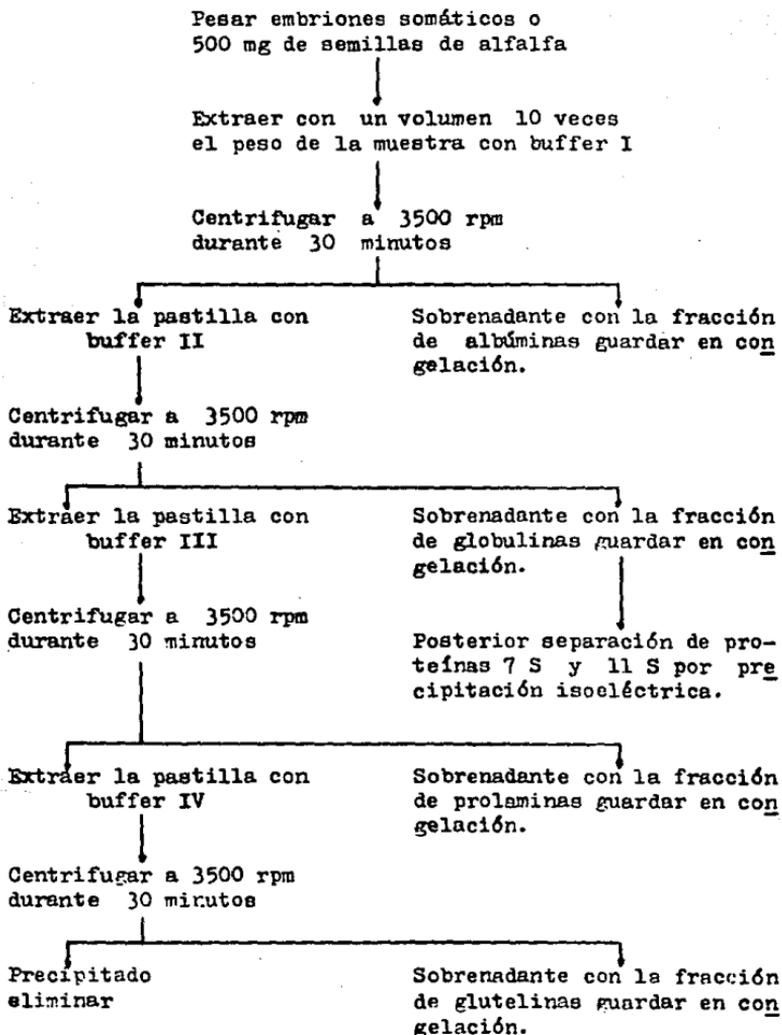
a - Buffers I a IV pH 7, buffer V pH 4.75.

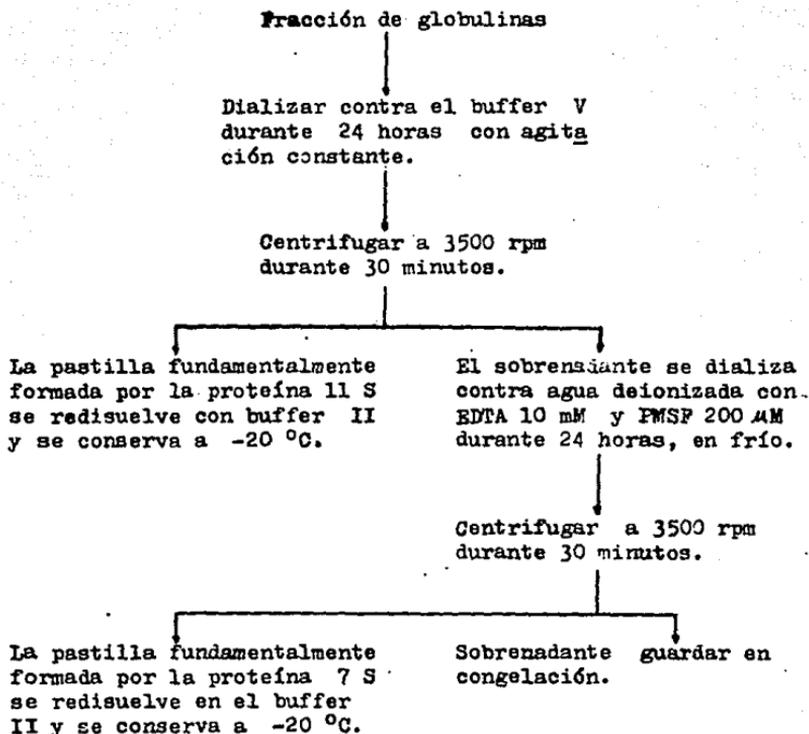
El protocolo de extracción de proteínas se indica en la figura 1, todo el proceso se lleva a cabo en frío (0 - 4 °C).

F.2. Separación de las proteínas de reserva 7 S y 11 S.

De la fracción de globulinas, extraídas a partir de semilla, se colocaron 15 ml de muestra en una membrana de diálisis, con el fin de separar las proteínas de reserva por precipitación isoeléctrica, de acuerdo al siguiente procedimiento:

Figura 1.- Diagrama de extracción de proteínas.





F.3. Cuantificación de proteínas por el método Bradford.

Reactivo de Bradford: Se disuelven 100 mg de indicador azul brillante G-250 en 50 ml de etanol al 95 %, a esta solución se le adiciona 100 ml de ácido fosfórico al 65 %, la solución resultante se diluye a 1 litro, se filtra y guarda en oscuridad (Bradford, 1976).

Solución patrón de proteínas: Se disuelven 25 mg de albúmina de suero bovino (BSA), en 100 ml de agua deionizada, la solución se guarda en frío, se tiene así una solución patrón con 250 μ g de proteína/ ml de solución.

Preparación de la curva tipo: Se tomaron muestras de proteína con diferentes alícuotas, de acuerdo con el siguiente cuadro:

Concentración de proteína BSA (μ g)	0	5	10	15	20	25
μ l de solución patrón de proteína.	0	20	40	60	80	100
μ l de agua deionizada	100	80	60	40	20	0

A cada muestra se añade 1 ml del reactivo de Bradford y se agita inmediatamente en un vortex y se lee absorbancia de las muestras en espectrofotómetro a 595 nm (la curva tipo se hizo por triplicado).

Quantificación de proteína: Los extractos de las diferentes fracciones de proteínas, provenientes de los experimentos de: separación de las fases de inducción y desarrollo en embriones somáticos de alfalfa; efecto de diferentes tipos de "stresas" en el desarrollo de embriones somáticos y de las semillas de alfalfa A 7J.34, fueron diluidas (1:100 ó 1:50), de acuerdo a si la muestra se observaba concentrada o diluida, a estas diluciones se les determinó contenido de proteína de acuerdo al siguiente cuadro:

Muestra	Dilución de muestra	Volumen tomado	H ₂ O añadida
Proteínas de semilla	1:100	50 μ l	50 μ l
Proteínas de embriones somáticos	1:50	100 μ l	0 μ l
Proteínas de callo	1:50	100 μ l	0 μ l
Blanco	--	0 μ l	100 μ l

A cada muestra se le agregó 1 ml del reactivo de Bradford y se agitó inmediatamente en un vortex antes de leer absorbancia en el espectrofotómetro a 595 nm. La concentración de proteínas de cada muestra se determinó por interpolación en la curva tipo, la cual fue ajustada por el método de mínimos cuadrados.

F.4. Caracterización del patrón de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.

Para seguir la síntesis de proteínas durante el desarrollo de embriones somáticos de alfalfa A 70.34 y Fl.1 sometidos a diferentes tipos de "stress", así como en la separación de las fases de inducción y desarrollo de embriones somáticos de alfalfa A 70.34, se utilizó la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS), en condiciones desnaturizantes de acuerdo al método de Laemmli (1970). Se empleó un aparato de electroforesis vertical con capacidad para 2

geles por corrida, cada gel con un espesor de 1.5 mm.

Las principales soluciones empleadas en la técnica se indican en el siguiente cuadro:

Solución	Stock	Volumen (ml)	Composición
I Buffer de muestra	5 X	50	SDS 5 g, glicerol 5 ml, Tris-base 2.5 g pH 6.8. En el momento de preparar la muestra agregar 5% de B-mercaptoetanol y 0.01% de azul de bromofenol.
II Buffer para el gel de corrida	4 X	100	Tris-base 18.2 g pH 8.8
III Buffer para el gel de cargado	2 X	100	Tris-base 3.5 g pH 6.8
IV Buffer de corrida	10 X	1000	Tris-base 30.2 g, glicina 144 g, SDS al 1 %. pH 8.4
V Acrilamida	1 X	100	Acrilamida 30.0 g y Tris-base 0.8 g, filtrar y guardar en obscuridad.
VI Fijador y colorante	1 X	1000	Metanol 50%, ácido acético glacial 10%, azul de Coomassie 0.25% en agua deionizada.
VII Desteñidor	1 X	1000	Metanol 40%, ácido acético glacial 10% y agua 50%.

Preparación de muestras.

Una vez determinada la concentración de proteína de las muestras, provenientes de semilla y embriones somáticos, se prepara-

ron para la electroforesis. Se hicieron los cálculos respectivos para preparar muestras con una concentración de proteína de 60 $\mu\text{g}/50\text{ ml}$ de buffer de muestra.

ejemplo:

Si el contenido de proteína de una muestra de embriones somáticos o semilla fuera de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de muestra, y se necesitara 350 ml de solución con 60 μg de proteína/ 50 ml de buffer de muestra (suficiente para 3 ó 4 corridas por electroforesis en gel de poli-acrilamida-SDS), se agregaría; 70 ml de buffer de muestra (el stock se encuentra 5 veces concentrado), 42 ml de muestra (para tener 420 μg de proteína) y 238 ml de agua deionizada para completar los 350 ml de solución requerida.

Las muestras se agitaron en un vortex por 1 minuto y se colocaron en un baño de agua hirviendo por 5 minutos. Como marcadores de peso molecular se preparó una solución estandar de proteínas (laboratorios BIO-RAD), tomando 10 ml de proteínas estandar y agregando 190 ml de buffer de muestra (dilución 1:20), de igual forma la solución con marcadores se agitó y se puso en agua hirviendo. El peso molecular de las proteínas usadas como marcadores se muestra en el siguiente cuadro:

<u>Proteína</u>	<u>Peso molecular</u>
Fosforilasa B	92,500
Albumina de suero bovino	66,200
Ovoalbumina	45,000
Anhidrasa carbónica	31,000
Inhibidor de tripsina	21,500
Lisosima	14,400

Preparación del gel.

El gel de corrida se preparó al 11%, mezclando: 21.6 ml de agua, 14 ml de buffer 4 X, 200 μ l de SDS al 20% y 20 ml de acrilamida. Como catalizadores para polimerizar la acrilamida se agregó 40 μ l de TEMED y 600 μ l de persulfato de amonio al 10%. En este momento se debe tener ya montadas las placas de vidrio, perfectamente limpias, para vaciar el gel.

El gel fue adicionado a las placas de vidrio, inmediatamente que se preparó, sin llenarlas, dejando un espacio de aproximadamente 4 cm para posteriormente colocar el gel de cargado. Para que el gel de corrida tenga un frente homogéneo se agregan algunos mililitros de SDS al 1%, se espera a que la acrilamida gelifique, entonces se lava 2 ó 3 veces la superficie del gel, con agua deionizada, para eliminar el SDS. Una vez que ocurrió la gelificación se coloca un peine con un número de "dientes" de acuerdo al número de carriles que se desee en el gel (10, 15 ó 20).

El gel de cargado se preparó, aproximadamente al 4.5 %, mezclando: 6.2 ml de agua deionizada, 8.7 ml de stock 2 X, 100 μ l de SDS al 20% y 2.5 ml de acrilamida. Como catalizadores se agregó 20 μ l de TEMED y 100 μ l de persulfato de amonio al 10%. Este gel se agrega inmediatamente sobre el gel de corrida.

Pasados 20-30 minutos de que el gel de cargado gelificó, se quitó el peine cuidadosamente, para evitar resecaedad se llenaron los carriles con buffer de corrida. El tamaño del gel es de 140 x 120 x 1.5 mm.

Cargado y corrido de muestras.

Las muestras ya preparadas se colocaron en los carriles del gel, el volumen fue de acuerdo al número de carriles por gel, - 70, 120 y 160 μ l para geles con 20, 15 y 10 carriles respectivamente (en cada gel se colocó un carril con 30 μ l de muestra con los marcadores de peso molecular).

La corrida del gel se llevó a cabo, primero a corriente constante, 40 miliamperes durante 20-25 minutos, entonces se aumento la corriente a 70 miliamperes, cuando el voltaje alcanzó 210-230 volts, se disminuía la corriente de manera que no pasara este intervalo de voltaje. El tiempo de corrida por lo general fue de 4 a 5 horas, entonces se bajo a cero la corriente, se desensambló el aparato y se sacaron cuidadosamente los geles, para distinguirlos se marcó el lado superior derecho de uno de ellos.

Teñido y desteñido del gel.

La coloración del gel se realizó con azul de Coomassie (solución VI), cada gel se colocó en un recipiente cerrado con colorante durante 24 horas. Para desteñir el gel se quito el colorante y se colocó el gel en solución desteñidora, la operación se repite hasta que las bandas de proteína sean bien definidas.

Tomando como referencia el patrón de proteínas de semilla - de alfalfa A 70.34 en cada una de sus fracciones, se hizo un análisis del tipo de proteínas presentes en embriones somáticos y callos provenientes de diferentes tratamientos y experimentos. El peso molecular aproximado de las diferentes bandas se determinó por comparación con los estándares de proteína, cuyo peso molecular es conocido.

G. DESARROLLO DE LA MATRIZ DE ENCAPSULACION PARA EMBRIONES SOMATICOS.

G.1. Producción de cápsulas de alginato y pectinato.

Con el objetivo de desarrollar una matriz de encapsulación para embriones somáticos, que tuviera: forma esférica, tamaño suficiente para contener embriones somáticos de 2 a 4 mm de longitud, consistencia adecuada para su manejo y al mismo tiempo que permitiera la nutrición y germinación de embriones somáticos, se probaron dos tipos de geles; alginato de sodio y ácido poligalacturónico (pectinato). La producción de cápsulas de gel se obtuvo aprovechando sus propiedades químicas. En cuanto el alginato de sodio (soluble en agua) o el pectinato (soluble en agua a pH mayor a 4), entran en contacto con soluciones de sales de calcio, ocurre una reacción de intercambio iónico, formándose los geles de alginato de calcio (Redenbaugh et al., 1986a) y poligalacturonato de calcio (Magaña, 1987).

Se utilizaron 3 tipos de alginato; baja, media y alta viscosidad (250, 3500 y 14000 centipoises, respectivamente) y ácido poligalacturónico (98 % de pureza), ambos geles de Sigma Chemical Co., para producir cápsulas de alginato de calcio y poligalacturonato de calcio.

Cada tipo de alginato de sodio se preparó a diferentes concentraciones (cuadro 4), en solución salina de NaCl al 0.85 % (Mullon, 1987), cuidando que el alginato quedara bien disuelto. También se preparó ácido poligalacturónico a diferentes concentraciones en agua deionizada (cuadro 5), ajustando el pH de las soluciones a 6.0 ± 0.1 con NH_4OH concentrado (Magaña, 1987).

Cuadro 4.- Determinación de la concentración de gel y agente de complejación para producir esferas de alginato

Concentración de CaCl_2 (mM)	Alginato de sodio ^{&} (%)			
	0.5	1.0	1.5	2.0
12.5	+	+	+	+
25.0	+	+	+	+
50.0	+	+	+	+
100.0	+	+	+	+
200.0	+	+	+	+

& - Concentraciones utilizadas en los 3 tipos de alginato.

Cuadro 5.- Determinación de la concentración de gel y agente de complejación para producir esferas de pectinato

Concentración de CaCl_2 (mM) ²	Acido poligalacturónico (%)		
	6.0	7.0	8.0
50.0	+	+	+
100.0	+	+	+
200.0	+	+	+
300.0	+	+	+
400.0	+	+	+

Como agente de complejación (sal de calcio) para producir las cápsulas se utilizaron soluciones de cloruro de calcio a diferentes molaridades (ver cuadros 4 y 5).

La producción de cápsulas de gel se llevó a cabo, goteando lentamente las soluciones de alginato y pectinato en las soluciones de calcio. La reacción de intercambio iónico entre gel y sal de calcio es inmediata y se obtienen cápsulas de gel insolubles en agua. Como instrumento de goteo se usaron capilares de 3.5 ± 0.1 mm de diámetro. El tiempo de complejación que se aplico para formar las cápsulas fue de 25 a 30 minutos. Se evaluaron forma, peso, tamaño y consistencia de las cápsulas formadas.

G.2. Redisolución de cápsulas de alginato y pectinato.

Con fin de liberar de su cápsula a embriones somáticos encapsulados y así evaluar directamente su comportamiento a la encapsulación (visibilidad, ganancia de peso fresco y seco, etc.), se desarrollaron pruebas de solubilización de cápsulas de alginato y pectinato.

Para la redisolución de cápsulas de alginato se utilizaron soluciones de citrato de amonio y citrato de sodio a diferentes concentraciones y pHs, de acuerdo al diseño presentado en el siguiente cuadro, cada solución en presencia de EDTA al 2 % para quelar el calcio liberado.

Citrato de sodio o amonio (%) + 2% EDTA	pH		
	5.5	6.5	7.5
2.0	+	+	+
3.0	+	+	+
4.0	+	+	+

Se colocaron 15 cápsulas de alginato (viscosidad media, 3500 cps.) al 1.25 % en 7.5 ml de cada solución de citrato y a cada pH, en cada uno de los tratamientos se probaron dos tipos de condiciones: con agitación (producida por un pequeño agitador magnético) y sin agitación. Se evaluó el tiempo que tardaron en redisolverse las cápsulas.

Un procedimiento de redisolución de cápsulas de pectinato, que fue utilizado en la presente investigación, es el propuesto por Garcia y Arellano (1988). Las cápsulas de pectinato al 7.5 % fueron redisueltas en buffer de fosfatos 200 mM a pH 6.0 ± 0.1 en presencia de EDTA al 1.5 %, el tiempo de redisolución es de 1 a 2 horas, se se desea redisolverse en menos tiempo se puede aplicar agitación con una parrilla de agitación magnética.

G.3. Difusión de nitrógeno de medio de cultivo a cápsulas.

Con el fin de comprobar y evaluar la difusión de nitrógeno del medio de cultivo a cápsulas de gel en e. tiempo, se realizó el siguiente experimento, se preparó medio de cultivo SH para germinación de embriones somáticos (usado en el protocolo original para alfalfa A 70.34), en cada frasco gerber se colocaron -

20 ml de medio de cultivo. Se prepararon 480 cápsulas de pectinato al 7.5 % en CaCl_2 200 mM y se sembraron (en condiciones de esterilidad) en los frascos con el medio de cultivo, se colocaron 30 cápsulas por frasco. Cada 3 horas se muestreó 30 cápsulas hasta completar 16 muestras.

Digestión de cápsulas. De cada muestra se colocaron 15 cápsulas de pectinato (aproximadamente 1.1 g) en matraces micro-Kjeldahal y se les agregó 2.0 ml de H_2SO_4 concentrado, 1.5 ml de H_2O_2 (catalizador) y 0.1 g de Na_2SO_4 (para elevar el punto de ebullición del ácido). Se digirieron las muestras por 30 minutos, el digerido se neutralizó con NaOH al 40 % y se aforó a 20 ml con agua deionizada.

Preparación de la curva tipo. Se prepararon diluciones de 1, 2, 3, 10 μg de nitrógeno/ml de solución a partir de una solución patrón de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 10 μg de nitrógeno/ ml de solución (pesar 47.16 mg de la sal y diluir a 1,000 ml).

A cada dilución (1 ml de volumen total), se le agregó 50 μl de EDTA al 5 % y 50 μl de reactivo de Nessler. Inmediatamente se tomó lectura de absorbancia en el espectrofotómetro a 420 nm (De León, 1985).

Cuantificación de nitrógeno. Del digerido de las 16 muestras se tomaron alícuotas de 1 ml (de cada muestra) y se les agregó 50 μl de EDTA al 5 % y 50 μl de reactivo de Nessler y se leyó absorbancia a 420 nm en el espectrofotómetro. Posteriormente con base en la curva tipo se determinó la concentración de nitrógeno que difundió del medio de cultivo a las cápsulas.

H. ENCAPSULACION DE EMBRIONES SOMATICOS.

H.1. Proceso de encapsulación.

A continuación se describe el procedimiento empleado para encapsular embriones somáticos de apio, producto de diferentes experimentos con el fin de estandarizar las condiciones de encapsulación para subsecuentes diseños experimentales.

Se utilizó alginato de sodio de viscosidad media (3500 - cps) al 1.25 %, disuelto en solución salina de NaCl al 0.85 %. La concentración de agente de complejación (CaCl_2) fue de 100 mM. En el caso de pectinato se utilizó al 7.5 % a pH 6.0 ± 0.1 , la concentración de cloruro de calcio en este caso fue de 200 mM.

Se utilizaron en todos los experimentos de encapsulación a embriones somáticos en estado torpedo con un tamaño de 2 a 4 mm. Todo el material y reactivos utilizados fueron esterilizados a 15-17 lb/in² y 121 °C durante 15-20 minutos.

Para encapsular embriones somáticos de apio, se mezclaron los embriones con el gel en cuestión (alginato o pectinato). Los embriones fueron succionados en condiciones de esterilidad - con un capilar de 3.5 mm de diámetro, entonces fueron goteados individualmente en la solución de calcio. Las cápsulas se dejaron en la solución complejadora por 25-30 minutos, entonces se lavaron 3 veces con agua estéril para quitar el exceso de calcio. Finalmente los embriones encapsulados fueron puestos en medio de germinación y de ahí a las condiciones de incubación descritas.

El testigo para evaluar el efecto de la encapsulación de em

briones somáticos de apio fueron embriones sin encapsular.

Después de 30 días se evaluó los porcentajes de germinación de embriones somáticos encapsulados y no encapsulados.

La viabilidad de embriones somáticos de apio encapsulados y no encapsulados se determinó usando cloruro de trifeniltetrazoleo (TTC), la técnica es muy utilizada en el análisis de viabilidad de semillas y consiste en colocar el embrión de una semilla expuesto a una solución de TTC 0.1-1.0 % durante cierto tiempo - (generalmente 4-6 horas), los productos de respiración del embrión reaccionan con el TTC formando un complejo colorido si el embrión es viable, si el embrión no es viable no se presenta coloración (Moreno, 1984). En el presente estudio para determinar viabilidad de embriones somáticos, únicamente se sumergían los embriones (encapsulados o no), en una solución de TTC al 0.1 % (concentración determinada después de varios ensayos), después de 7-8 horas se contó el número de embriones coloreados.

d.2. Cinética de crecimiento y viabilidad de embriones somáticos de apio encapsulados en alginato y pectinato.

Para determinar si la cubierta artificial, proporcionada a los embriones somáticos de apio, limitaba su germinación o conversión normal, se evaluó el crecimiento de embriones somáticos de apio utilizando el siguiente procedimiento:

250 embriones somáticos de apio fueron encapsulados en alginato de calcio, 250 en pectinato y 250 se dejaron sin encapsular, se emplearon las condiciones descritas en la sección ante-

rior. Todos los embriones fueron puestos en medio de germinación. Cada 3 días desde la siembra (día cero) hasta el 48, se tomaron muestras de 15 embriones de cada tratamiento (encapsulados y no encapsulados) y se evaluó: primero, porcentaje de viabilidad usando TTC al 0.1 %, posteriormente se redisolviéron las cápsulas con citrato de amonio al 2 % en presencia de EDTA al 2 % y finalmente se evaluó peso fresco y seco en cada una de las muestras.

H.3 Encapsulación de embriones somáticos de apio con geles de alginato y pectinato en medio de cultivo y de embriones sometidos a un pretratamiento con frío y obscuridad.

Para mejorar los porcentajes de germinación de embriones somáticos encapsulados de apio, se probó encapsular embriones incluyendo en el gel de alginato o pectinato al medio de cultivo.

Se preparó alginato de sodio al 1.25 % en solución salina 0.85 % y ácido poligalacturónico al 7.5 % pH 6.0 ± 0.1 , ambos geles en medio de germinación, se eliminó del medio el calcio para evitar gelificación prematura, como agente de complejación se utilizó cloruro de calcio 100 mM para producir cápsulas de alginato y 200 mM para cápsulas de pectinato (calcio disuelto en medio de cultivo). El proceso de encapsulación fue el descrito en secciones anteriores con la excepción de que una vez formadas las cápsulas, estas se lavaron con medio de cultivo.

En el experimento de encapsulación con medio de cultivo el control fueron embriones somáticos de apio encapsulados sin medio

de cultivo.

Otro experimento para mejorar la germinación de embriones somáticos de apio encapsulados en alginato al 1.25 % y pectinato al 7.5 %, consistió en pretratar a los embriones (antes de encapsular), en frío a $3^{\circ}\text{C} \pm 2$ y en obscuridad por 48 horas, - el procedimiento de encapsulación fue el ya descrito.

En el experimento de encapsulación con pretratamiento con frío y obscuridad se tomó un doble control: el primero fueron embriones somáticos con pretratamiento sin encapsular y el segundo embriones somáticos encapsulados sin pretratamiento.

Después de 30 días de estar los embriones somáticos de cada experimento en el medio de germinación, se evaluó el número de embriones germinados.

I. OBTENCION DE PLANTULAS EN CONDICIONES DE INVERNADERO.

Con objeto de ver si la encapsulación afecta la aclimatación de las plantas a condiciones de invernadero y para completar el esquema de propagación clonal por embriogénesis somática en apio, desarrollado por Vega (1987), se siguió el siguiente procedimiento para obtener plántulas de apio en condiciones de invernadero.

46 plántulas de apio provenientes de embriones somáticos en capsulados y 42 de embriones no encapsulados se trasplantaron a suelo para su aclimatación en invernadero. Primero se sacaron las plántulas del recipiente de cultivo, se les lavó el exceso de agar al chorro de la llave, posteriormente se sumergieron -

las raíces en una solución de fungicida (Promil al 2%, Navarro, 1985), en un ensayo se vió que este paso no es necesario. Inmediatamente se colocaron las plántulas en vasos de unicel con una mezcla estéril de suelo de monte-agrolita 2:1, se regaron las plántulas con las sales del medio MS al 50 %. Para que la disminución de la humedad relativa del cultivo fuera gradual, se cubrieron los vasos de unicel con una bolsa de polietileno transparente y se dejaron en fotoperíodo natural a media luz, la cual se incrementó gradualmente.

Después de 8 días se comenzaron a hacer perforaciones a la bolsa de plástico hasta que pasados varios días más, ya no fue necesaria la cubierta. Se evaluó el número de plántulas que lograron aclimatarse en suelo.

V. RESULTADOS Y DISCUSION.

A. PROTOCOLOS DE EMBRIOGENESIS SOMATICA.

El proceso de regeneración de plantas de alfalfa líneas A 70.34, Fl.1 y apio, vía embriogénesis somática, ha tenido éxito en los protocolos reportados por Villegas (1986), Meijer y Brown (1987), y Vega (1987), respectivamente, sin embargo es conveniente considerar algunos puntos:

La obtención de material vegetativo en condiciones asépticas a partir de semillas de alfalfa A 70.34 y apio no presentó problema alguno con el tratamiento de desinfección probado, una vez que se adquirió destreza en el manejo de las semillas. En alfalfa A 70.34, de cuatro siembras se tuvieron diferentes porcentajes de contaminación (1a., 20 %; 2a., 100 %; 3a., 30 % y 4a., 60 %).

En la siembra de semillas de apio ocasionalmente se tenía contaminación.

La respuesta embriogénica de plántulas provenientes de semilla, es muy variable, para superar este problema, en la mayoría de los reportes de embriogénesis somática en alfalfa, se utiliza selección recurrente (Reisch y Bingham, 1980; Mitten et al., 1984; Meijer y Brown, 1987), en el presente estudio, también se utilizó el mismo proceso. En las primeras siembras en donde se utilizaron pecíolos de plántulas de alfalfa A 70.34 seleccionadas al azar, la respuesta de embriogénesis fue muy baja, alrededor del 15 %, con un rendimiento promedio de 5 embriones por inóculo. En experimentos posteriores se identificaron las plántulas con mayor respuesta y se clonaron ya sea por entrenudos o por embriogénesis somática,

con lo que se logró alcanzar respuestas de hasta 90-95 %

Con respecto a la fuente de inóculo, prácticamente cualquier parte de la planta es capaz de producir callo (McCoy y Walker, 1984), en alfalfa bibliográficamente se aprecia un predominio en el uso de tejido embrionario cotiledón e hipocótilo, (ver cuadro 1 en la revisión de literatura), en la presente investigación, en alfalfa, se utilizó rutinariamente pecíolos de plántulas, de acuerdo al protocolo de Villegas y Brown (1987). En apio la fuente de inóculo fue comúnmente hojas cotiledonares de plántulas de 18-20 días de edad.

En alfalfa A 70.34 el proceso de embriogénesis somática se desarrolla del siguiente modo: pecíolos sembrados en medio B₅ con 2,4-D y Kn, se empiezan a hinchar después de 6 días de cultivo, a los 12 días se observa un callo amarillento y friable, entre los 18 y 22 días se identificaron los primeros embriones somáticos en estado globular, de los 22 a los 40 días se observa la inducción y desarrollo asincrónico de embriones somáticos globular, corazón y torpedo, a los 40 días se aprecian gran cantidad de embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo. El tamaño de embriones globulares de alfalfa A 70.34 es de alrededor de 0.5 mm, en estado corazón de 0.5 a 1.0 mm y embriones torpedo entre 2 y 4 mm, los embriones torpedo presentan una típica forma de botella, con un par de primordios cotiledonares (aunque los hay con 1 ó 3 cotiledones) y meristemas apical y radical. El color de los embriones es verde, siempre y cuando se desarrollen en fotoperíodo, si el desarrollo es en completa oscuridad, los embriones no adquieren la típica coloración verde; no obstante su rendimiento, respuesta y desarrollo es normal. Una descripción más amplia de la ontogenia de embriones somáticos de alfalfa a ni

vel histológico e histoquímico se encuentra en un estudio llevado a cabo simultáneamente a la presente investigación (Hernández, 1988).

El tiempo de obtención de embriones somáticos es variable, en alfalfa A 70.34 es posible observar embriones maduros, después de 25 días de cultivo, pero en la mayoría de los experimentos se dejaron los cultivos hasta los días 40-42, cuando se obtenían una mayor cantidad de embriones torpedo; a este respecto es de gran importancia obtener sincronía en las diferentes etapas de desarrollo, más adelante se discutirá el efecto del ácido abscísico y algunos ensayos hechos para incrementar la sincronía en alfalfa A 70.34.

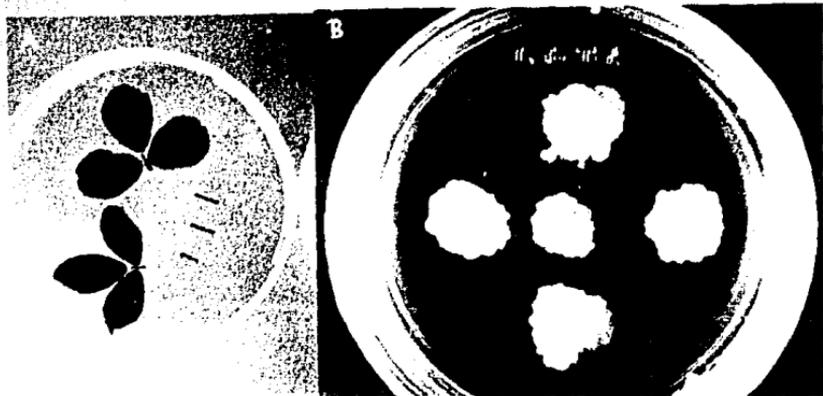
El porcentaje de germinación de embriones somáticos de alfalfa A 70.34, obtenido inicialmente fue de 10.5 %, asimismo se observó que la inducción de raíces fue pobre.

En la figura 2 se presentan fotografías que esquematizan el sistema de propagación in vitro por embriogénesis somática en alfalfa A 70.34.

En alfalfa Fl.1, pecíolos puestos en medio de inducción a los 5-6 días comienzan a hincharse, en el momento del trasplante a medio de desarrollo (día 12-15), se observan proembriones y embriones globulares, después de 10 a 12 días de estar los callos en medio de desarrollo se observa una mezcla de embriones en estado globular, corazón y torpedo. El tamaño y morfología de los embriones somáticos de alfalfa Fl.1 en estado globular y corazón, es muy similar a sus correspondientes de A 70.34, pero los embriones torpedo de alfalfa Fl.1 son ligeramente mayores a los de A 70.34. Con respecto a su apariencia, los embriones somáti-

Figura 2.- Embriogénesis somática in vitro en alfalfa A 70.34

- A) Pecíolos en medio de inducción.
- B) Callo en estado competente.
- C) Embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo; a - globular, b - corazón, c - torpedo.
- D) Embriones somáticos maduros, listos para el trasplante a medio de germinación.
- E) Plántula con 15 días en medio de germinación.
- F) Plántula después de 45 días en medio de germinación.



cos de alfalfa Fl.1 presentan menor cantidad de embriones anormales, poseen una coloración verde más intensa que los de A 70.34 y su tiempo de desarrollo es menor (35 días por 42 en alfalfa A 70.34). En alfalfa Fl.1 no es necesaria la selección recurrente para obtener altas respuestas y rendimientos, todas las diferencias se deben a que alfalfa Fl.1 es una línea con una alta contribución genética de *Medicago falcata*, como ha sido reportado por Mitten et al. (1984) y Brown y Atanassov (1985), a menor contribución genética de *Medicago falcata*, menor respuesta embriogénica.

En alfalfa Fl.1, la mayor cantidad de embriones somáticos maduros se obtiene alrededor del día 35, aunque Kao y Michayluk (- 1980) y Skokut et al. (1985), indican que obtienen embriones somáticos de alfalfa en 28 y 21 días, respectivamente, el tiempo no es el principal problema en la regeneración vía embriogénesis somática, sino la calidad y posteriormente la cantidad de embriones somáticos; lograr estos objetivos, requiere investigación en cada una de las etapas de embriogénesis somática de cualquier especie.

De 126 embriones somáticos de alfalfa Fl.1, sembrados en medio de terminación, se obtuvo un porcentaje de germinación del - 38 %.

En apio el sistema de embriogénesis somática presenta diferencias con respecto a los sistemas de alfalfa (fuente de inóculo, medio de cultivo, concentración de reguladores y tiempo de obtención). En apio el proceso de embriogénesis se desarrolla del siguiente modo: hojas cotiledonares, puestas en medio de inducción comienzan a producir callo después de 8-10 días, los primeros embriones somáticos en estado globular se observan a partir -

del día 20, el tamaño de estos embriones es más pequeño que el de sus correspondientes en alfalfa (alrededor de 0.3 mm), no se observa claramente la etapa de desarrollo de corazón, porque esta es muy rápida, la etapa torpedo es más larga y con crecimiento continuo hasta germinar, el tamaño de los embriones torpedo oscila entre 2 y 5 mm. Los embriones somáticos de apio son estructuras bipolares (con meristemas apical y radical), de color verde claro, con incipientes cotiledones y más alargados que los de alfalfa.

No fue posible cuantificar la respuesta de embriogénesis en hojas cotiledonares de apio, por la necesidad de disgregar el callus producido, por agitación del frasco de cultivo, para así lograr una mayor producción de embriones, se estima que existe una respuesta de alrededor del 20 %. Tampoco se hizo selección recurrente, siempre se partió de semillas, la respuesta se evaluó por frasco, en algunos de ellos era posible distinguir hasta 600 embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo. La germinación de embriones somáticos de apio fue rutinariamente de 85 a 90 %, para ello se utilizó embriones en estado torpedo con un tamaño entre 2 y 4 mm.

El sistema de embriogénesis somática en apio, fue propuesto como un modelo biológico y ha sido descrito ampliamente por Vega (1987), en el presente estudio se continuaron desarrollando algunos aspectos del cultivo in vitro de apio, para obtener las mejores condiciones de cultivo y probar el efecto de la encapsulación de embriones somáticos de esta especie.

Se comprobó que la obtención de embriones somáticos de apio es un proceso bien establecido, con rendimientos de más de 400 embriones por frasco de cultivo. En este sistema es posible obte

ner más de 10,000 embriones somáticos en las primeras 6 semanas de cultivo en sólo 25-30 frascos gerber, de acuerdo con Ammirato (1987), esta cifra puede incrementarse por cultivo en suspensión o en biorreactor; sin embargo el objetivo principal de la presente investigación fue desarrollar una metodología para encapsular embriones somáticos, con el fin de producir un análogo de una semilla sexual y aunque se observó que existen amplias perspectivas para el escalamiento en la producción de embriones somáticos de apio y alfalfa, se trabajó sólo a nivel de laboratorio. En el caso del sistema de embriogénesis somática en alfalfa se enfocaron los esfuerzos en lograr la obtención de embriones somáticos de alta calidad.

B. MANIPULACIONES REALIZADAS EN MEDIO Y CONDICIONES DE CULTIVO PARA OBTENER EMBRIONES SOMÁTICOS DE ALTA CALIDAD.

B.1. Separación de las fases de inducción y desarrollo de embriones somáticos de alfalfa A 70.34 y apio tipo Tall Utah 52-70.

Uno de los factores que limitan la obtención de embriones somáticos de alta calidad, es la continua acción de los reguladores del crecimiento (principalmente el 2,4-D), durante el desarrollo de los embriones somáticos. Una vez que el proceso embriogénico se ha disparado, la acción del 2,4-D puede redundar en la obtención de embriones anormales, alta asincronía y en algunas especies como zanahoria, inhibir el desarrollo embrionario a menos que se elimine o disminuya la concentración de la auxina en el medio de cultivo (Sung et al., 1984)

En alfalfa A 70.34 es posible obtener embriones somáticos en el mismo medio de inducción (ver protocolo original), sin embargo con la separación de las fases de inducción y desarrollo, se obtienen embriones de mejor apariencia y es posible realizar experimentos de sincronización sin el efecto de reguladores del crecimiento, en este punto Stuart et al. (1985), han demostrado que altas concentraciones de 2,4-D en las últimas etapas de desarrollo disminuyen sensiblemente la tasa de síntesis de proteínas de reserva, resultados similares se obtuvieron en alfalfa A 70.34.

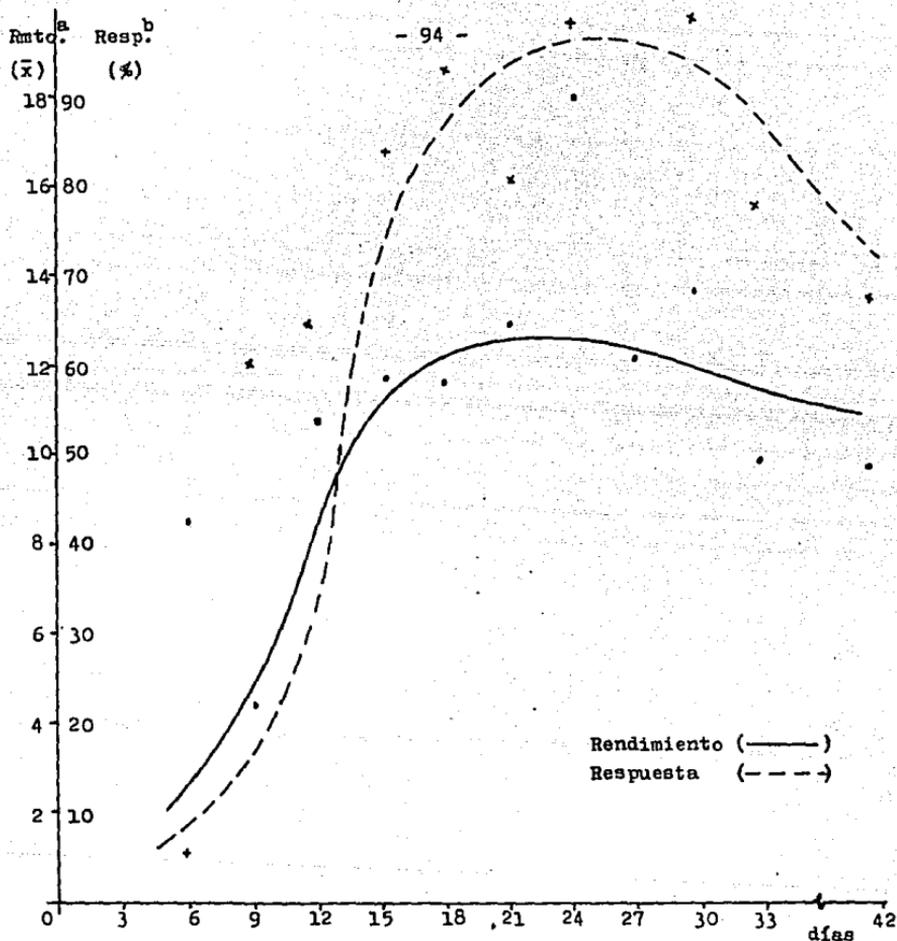
En el cuadro 6 y gráfica 1 se puede observar que sólo se necesita de 12 a 15 días de inducción en presencia de reguladores -

Cuadro 6.- Respuesta y rendimiento de embriones somáticos en pa
cíolos de alfalfa A 70.34, sometidos a diferentes
tiempos en medio de inducción con reguladores del
crecimiento y posterior trasplante a medio de desa
rrollo sin reguladores.

Tratamiento, días en:		Respuesta ^a (%)	Rendimiento ^b (\bar{x})
Medio de Inducción	Medio de Desarrollo		
0	42	0.0	0.0
3	39	0.0	0.0
6	36	6.6	8.0 ± 0.7
9	33	60.0	5.0 ± 3.7
12	30	63.8	11.0 ± 7.0
15	27	84.6	12.0 ± 8.2
18	24	93.7	12.0 ± 7.8
21	21	80.0	13.0 ± 6.9
24	18	96.1	18.0 ± 10.8
27	15	95.8	12.0 ± 8.3
30	12	96.8	14.0 ± 8.1
33	9	77.7	10.0 ± 5.8
42	0	67.5	10.0 ± 5.8

a - Respuesta; Número de callos con embriones/número de callos.

b - Rendimiento; Promedio del número de embriones/callos.



a - Rendimiento - Promedio del No. de embriones/inóculo. inducción.
 b - Respuesta - No. de callos con embriones/No. de callos.

Gráfica 1.- Embriones somáticos obtenidos en pecíolos de alfalfa A - 70.34, sometidos a diferentes tiempos en medio de inducción con reguladores del crecimiento y posterior trasplante a medio de desarrollo, sin reguladores.

para obtener respuestas y rendimientos altos, incluso se observa que el rendimiento de inóculos sometidos a inducción por 42 días es menor, un período adecuado para inducir los mejores rendimientos de embriones somáticos en alfalfa A 70.34 es de 12 a 24 días.

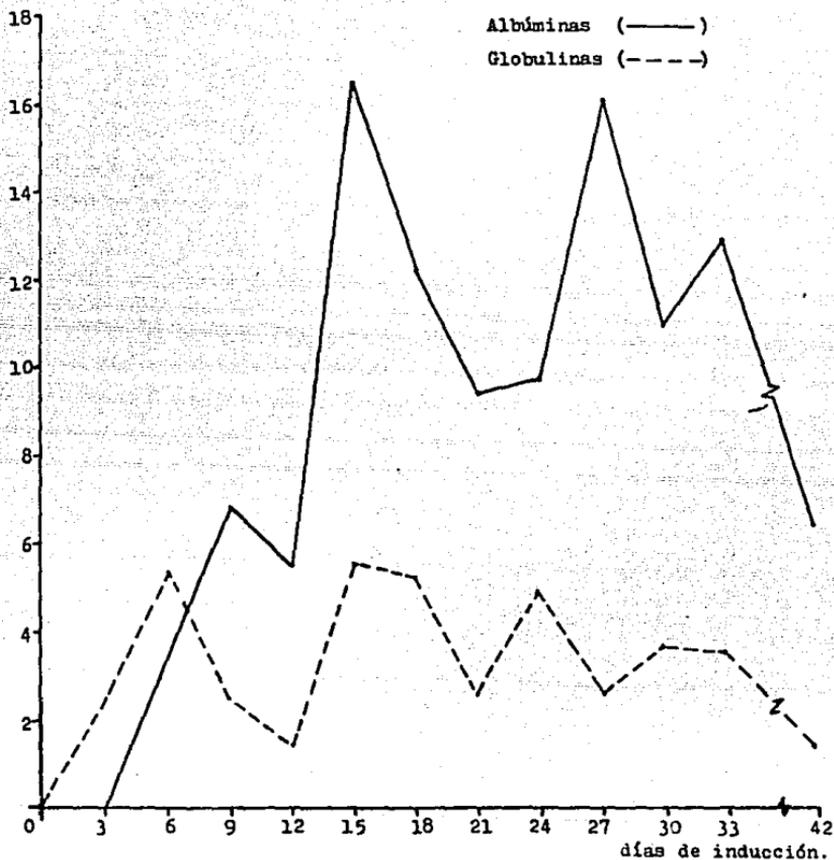
En el mismo experimento se encontró que la mayor cantidad de proteínas sintetizadas ocurrió cuando el transplante de medio de inducción a medio de desarrollo se hizo a los 15 días (gráfica - 2), en esta se observa un constante recambio en la síntesis de proteínas, no hay un máximo aparente, en el caso de albúminas el mayor valor se obtiene alrededor del día 15 y luego vuelve a aumentar el día 27, en globulinas el mayor valor es alrededor del día 15, posteriormente hay una ligera tendencia a decrecer la síntesis de proteínas con el tiempo, lo que indica que no hay acumulación de proteínas de reserva, por supuesto que el proceso no es sincrónico, pero con el tiempo la población de embriones torpedo aumenta y por lo tanto debería aumentar el contenido de globulinas (en donde se encuentran las proteínas 7 S y 11 S).

Hasta hace poco tiempo los reportes de embriogénesis somática, habían basado la calidad de los embriones en criterios morfológicos, que dependían del punto de vista del investigador; el uso de marcadores bioquímicos proporcionará bases más objetivas, - para obtener embriones somáticos de calidad. De acuerdo con Stuart et al. (1985), las proteínas de reserva 7 S y 11 S al ser embrio y estado-específicas indican la calidad de un embrión; a mayor contenido de proteínas de reserva en un embrión, habrá mayor oportunidad de supervivencia y germinación, en el anterior experimento se demostró la síntesis de proteínas de reserva, el siguiente paso es lograr la acumulación de proteínas 7 S y 11 S.

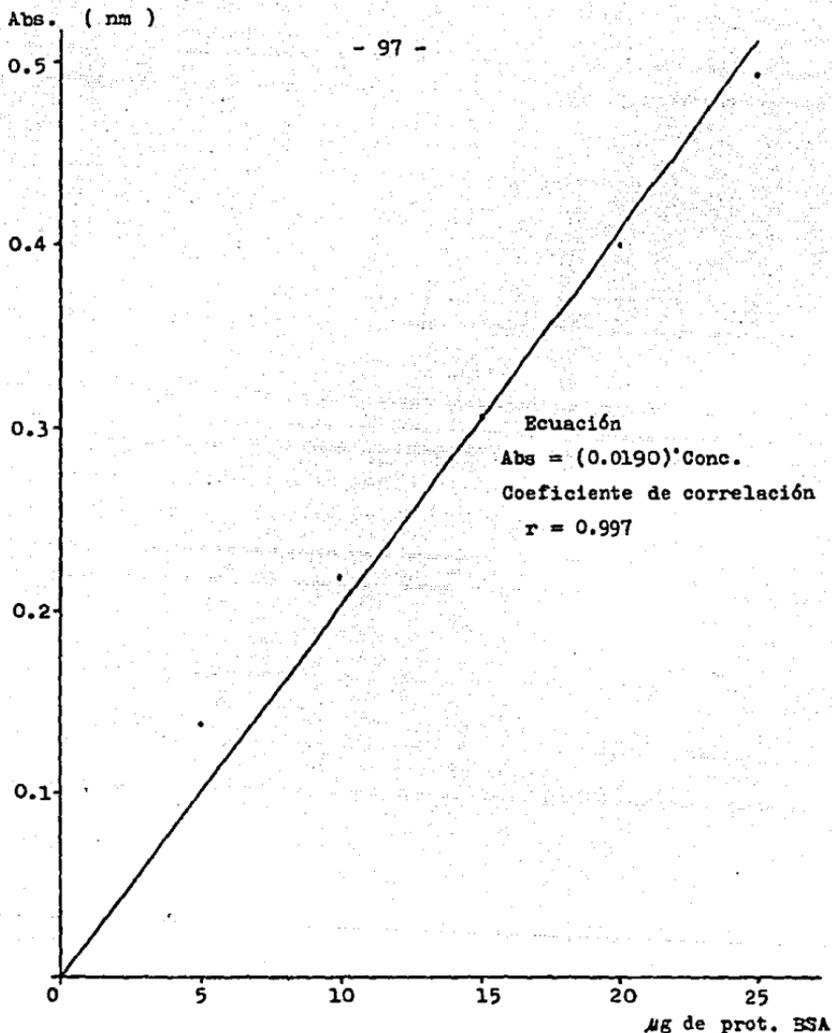
En la gráfica 3 se indica la curva tipo empleada para la eva

(mg prot./g p.f.)

- 96 -



Gráfica 2.- Contenido de proteínas en embriones somáticos de alfalfa A 70.34, desarrollados en diferentes tiempos en medio de inducción y posterior trasplante a medio de desarrollo.



Gráfica 3.- Curva tipo utilizada en la evaluación de contenido de proteínas en embriones somáticos de alfalfa A 70.34 y Fl.1 (proteína estandar BSA, albúmina de suero bovino).

luación del contenido de proteínas, en embriones somáticos de alfalfa A 70.34 y Fl.1.

En apio la continua acción del 2,4-D produce poblaciones de embriones asincrónicas, en el cuadro 7 se observa que después de 30 días de inducción, muchos embriones empiezan a germinar en el mismo medio de inducción, mientras que otros se encontraban en diferentes etapas de desarrollo.

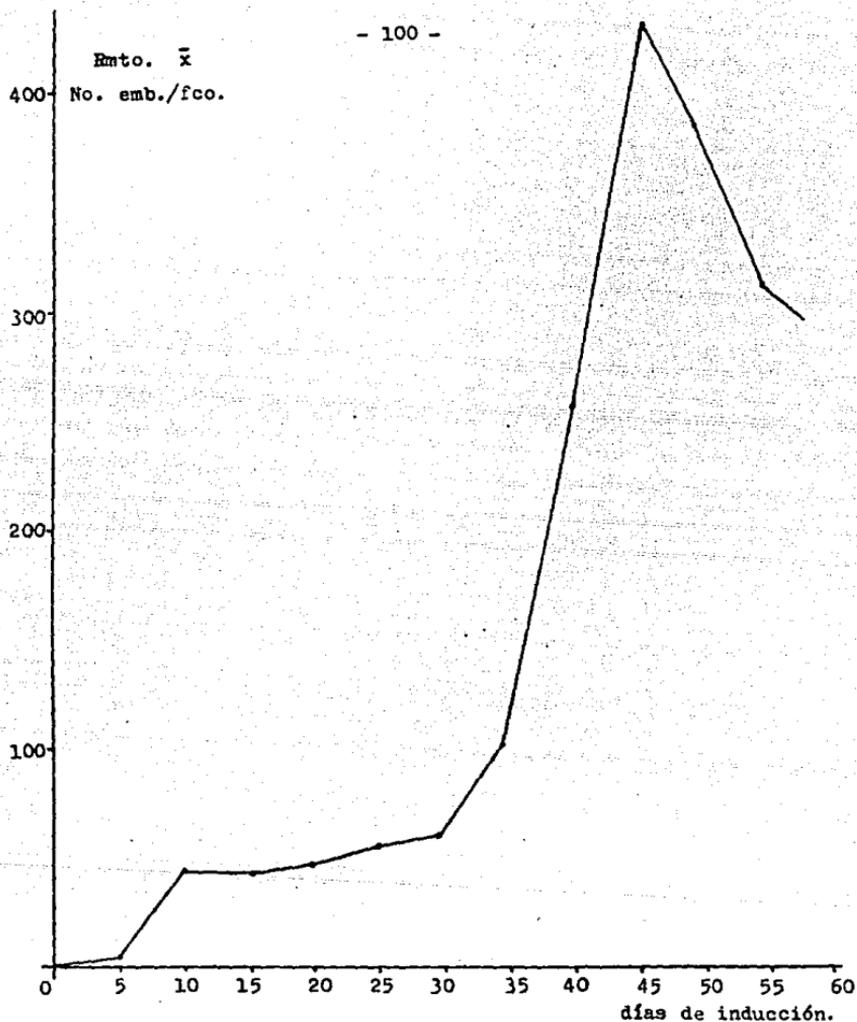
En la gráfica 4 se observa que la mayor producción de embriones somáticos de apio, se obtiene cuando el trasplante de medio de inducción a medio de desarrollo se realiza a los 45 días, no obstante a este tiempo una gran cantidad de embriones ha germinado en el medio de inducción, lo que dificulta su manejo. Un tiempo adecuado de inducción en presencia de reguladoras del crecimiento en apio Tall Utah 52-70 es de 35 a 40 días, con lo que se asegura una alta producción de embriones somáticos. El desarrollo de los embriones se lleva a cabo en los siguientes 10 ó 15 días en medio sin reguladores, para finalmente rescatarlos y sembrarlos en medio de germinación, que en este caso fue el mismo que el de desarrollo, con la diferencia de que el embrión continua su desarrollo en forma individualizada.

Actualmente y continuando con esta línea de investigación, se está trabajando en la caracterización del patrón de proteínas de semillas de apio, para compararlo con el de embriones somáticos (Vega, 1988; comunicación personal).

B.2. Efecto de casaminoácidos en el desarrollo de embriones somáticos de alfalfa A 70.34.

Cuadro 7.- Rendimiento de embriones somáticos de apio, provenientes de hojas cotiledonares sometidas a diferentes tiempos en medio de inducción con reguladores y posterior trasplante a medio de desarrollo sin reguladores.

Tratamiento días en:		Rendimiento por frasco (\bar{x})	Embriones que germinaron en el medio de inducción (%)
Medio de Inducción	Medio de Desarrollo		
0	60	0.0	
5	55	3.0 ± 3.0	
10	50	43.0 ± 7.5	
15	45	42.0 ± 15.3	
20	40	46.0 ± 4.0	
25	35	56.0 ± 6.0	1.1
30	30	58.0 ± 16.0	14.8
35	25	102.0 ± 25.5	17.9
40	20	253.0 ± 61.1	13.8
45	15	433.0 ± 47.2	16.1
50	10	380.0 ± 95.3	14.0
55	5	306.0 ± 58.5	13.5
60	0	285.0 ± 39.0	7.0



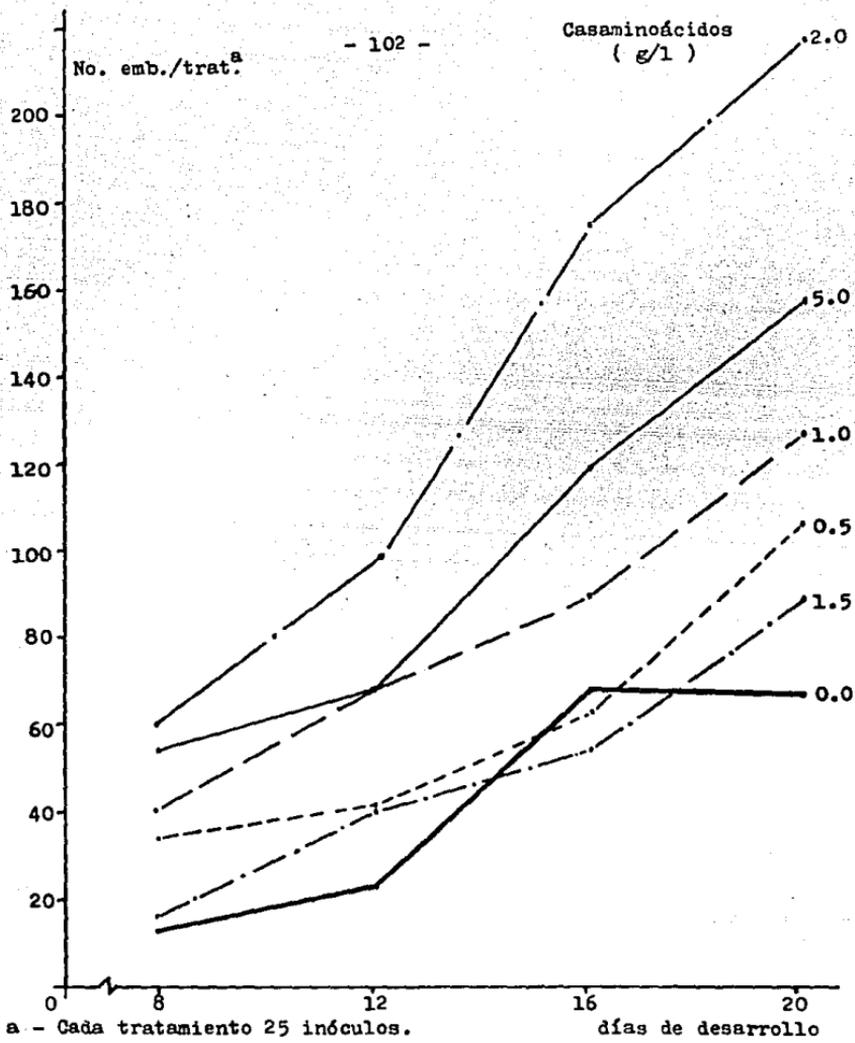
Gráfica 4.- Embriones somáticos obtenidos en cotiledones de apio, sometidos a diferentes tiempos en medio de inducción con reguladores del crecimiento y posterior trasplante a medio de desarrollo, sin reguladores.

La adición de aminoácidos a los medios de cultivo aumenta la producción y mejora la morfología de embriones somáticos en alfalfa (Stuart et al., 1985; Skokut et al., 1985; Meijer y Brown, 1987), siguiendo este fin se evaluó el efecto de casaminoácidos (caseína hidrolizada), en el desarrollo de embriones somáticos de alfalfa A 70.34.

En la gráfica 5, se observa que la mayor producción de embriones se obtiene, adicionando al medio de desarrollo 2 g/l de casaminoácidos, concentración propuesta por Meijer y Brown (1987), - sin embargo de acuerdo al cuadro 8, el mayor porcentaje de germinación (33 %) y donde se obtuvieron plántulas de mayor tamaño y vigor fue a 1.5 g/l de casaminoácidos. De estos resultados y de otros experimentos (análisis de proteínas, efecto de casaminoácidos en la inducción de embriogénesis, etc.), se creó un compromiso, por un lado alta producción de embriones somáticos con 2 g/l de casaminoácidos y por otro germinación que produce plántulas con mayor vigor y tamaño con 1.5 g/l de casaminoácidos, de aquí que en posteriores experimentos se encontró que la concentración más adecuada de casaminoácidos que hay que agregar al medio de desarrollo, para mejorar la cantidad y calidad de embriones somáticos de alfalfa A 70.34 es de 1.75 g/l.

En este experimento la respuesta en embriogénesis somática - alcanzó porcentajes mayores al 60 % y en algunos tratamientos hasta el 80 % (cuadro 8), los rendimientos también aumentaron sensiblemente, lo que indica la efectividad de los ciclos de selección recurrente, en experimentos posteriores se obtuvieron respuestas y rendimientos mayores.

Con respecto a la sincronización de las etapas de desarrollo en la gráfica 6 y la figura 3, se observan los porcentajes de em



Gráfica 5.- Producción y desarrollo de embriones somáticos de alfalfa A 70.34, con diferentes concentraciones de casaminoácidos (caseína hidrolizada), en el medio de desarrollo.

Cuadro 8 .- Respuesta, rendimiento y germinación de embriones somáticos de alfalfa A 70.34 en diferentes tratamientos con casaminoácidos (CASA), aplicados al medio de desarrollo.

CASA (g/l)	Respuesta (%)	Rendimiento (\bar{x})	Germinación (%)
0.0	72.0	5.0 \pm 2.3	27.0
0.5	80.0	5.0 \pm 4.1	16.0
1.0	64.0	8.0 \pm 7.2	24.0
1.5	72.0	6.0 \pm 3.5	33.0
2.0	80.0	9.0 \pm 7.4	31.0
5.0	76.0	8.0 \pm 4.8	28.0

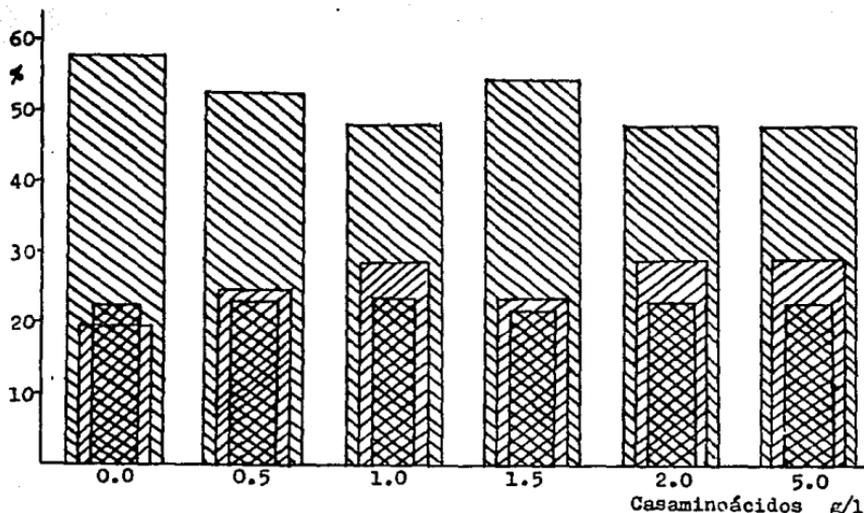
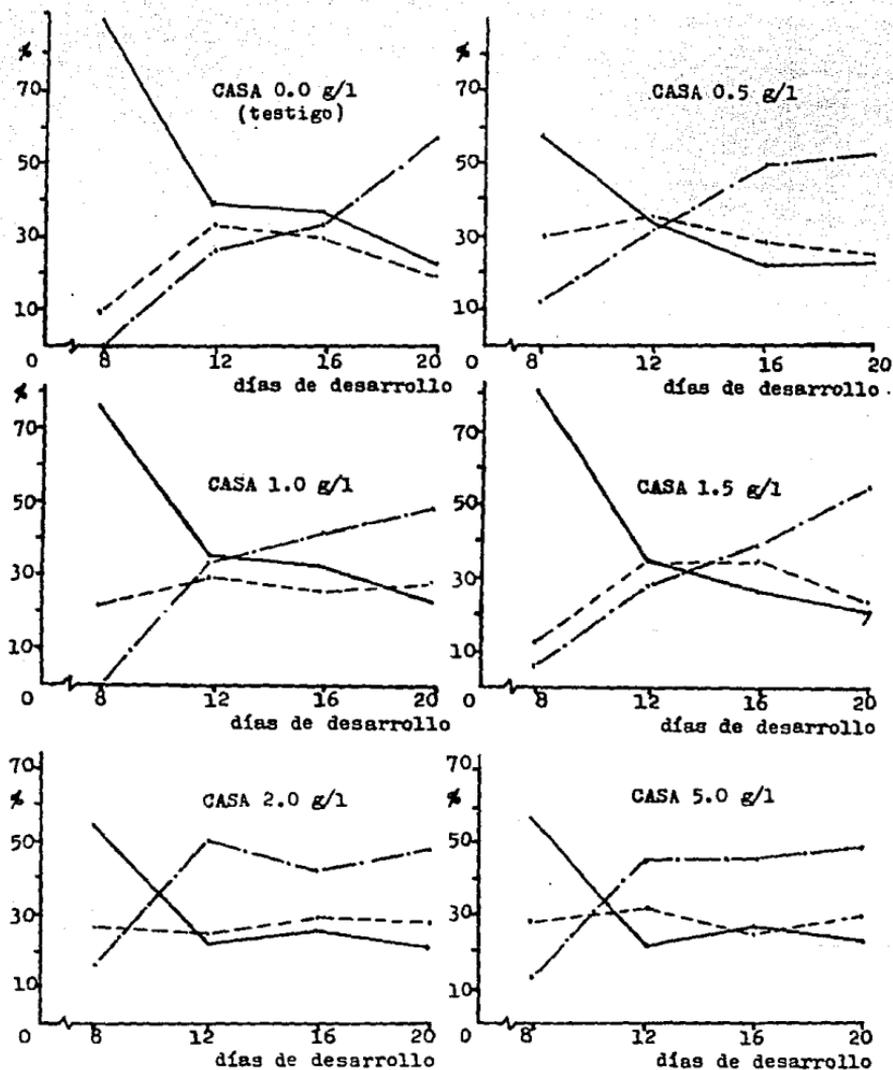


Figura 3.- Porcentajes de embriones somáticos de alfalfa A 70.34, globular (▨), corazón (▧) y torpedo (▩), al final de su desarrollo en diferentes tratamientos con casaminoácidos.



Gráfica 6.- Efecto de casaminoácidos (CASA) en los porcentajes de etapas de desarrollo globular (—), corazón (---) y torpedo (-.-) de embriones somáticos de alfalfa A 70.34.

briones en estado globular, corazón y torpedo durante el desarrollo y al final del experimento. En cada uno de los tratamientos con casaminoácidos, se aprecia que la sincronización no es buena, durante el desarrollo se encontraron poblaciones de embriones, en cada una de las etapas de desarrollo y al final del experimento, los porcentajes de embriones en estado de torpedo, no sobrepasaron en ningún tratamiento el 60 %.

B.3. Efecto de casaminoácidos en la inducción de embriones somáticos de alfalfa A 70.34.

Con el fin de determinar si la concentración más adecuada de casaminoácidos (1.75 g/l) en el medio de desarrollo, tenía algún efecto sobre el rendimiento de embriones somáticos de alfalfa A 70.34 durante la inducción, se probó adicionar esta concentración de aminoácidos al medio de inducción.

En el cuadro 9, se aprecia que si bien la adición de aminoácidos aumenta el rendimiento de embriones somáticos, la diferencia no es significativa en comparación cuando no se agregó casaminoácidos al medio de inducción, en cambio el rendimiento es menor cuando los embriones crecen sin aminoácidos tanto en la inducción como en el desarrollo; con respecto a la respuesta, todos los tratamientos tienen resultados similares, lo que permite inferir que los casaminoácidos tienen influencia principalmente en el rendimiento pero no en la respuesta embriogénica de alfalfa A 70.34.

La germinación de los diferentes tratamientos es muy similar, sin embargo los tratamientos con casaminoácidos produjeron plántulas con mayor tamaño y vigor, que cuando los embriones crecieron

en ausencia de aminoácidos. De este experimento es de suponer que los aminoácidos no tengan efecto en la inducción de la embriogénesis somática de alfalfa A 70.34 y que su influencia principal sea durante la diferenciación de los embriones somáticos.

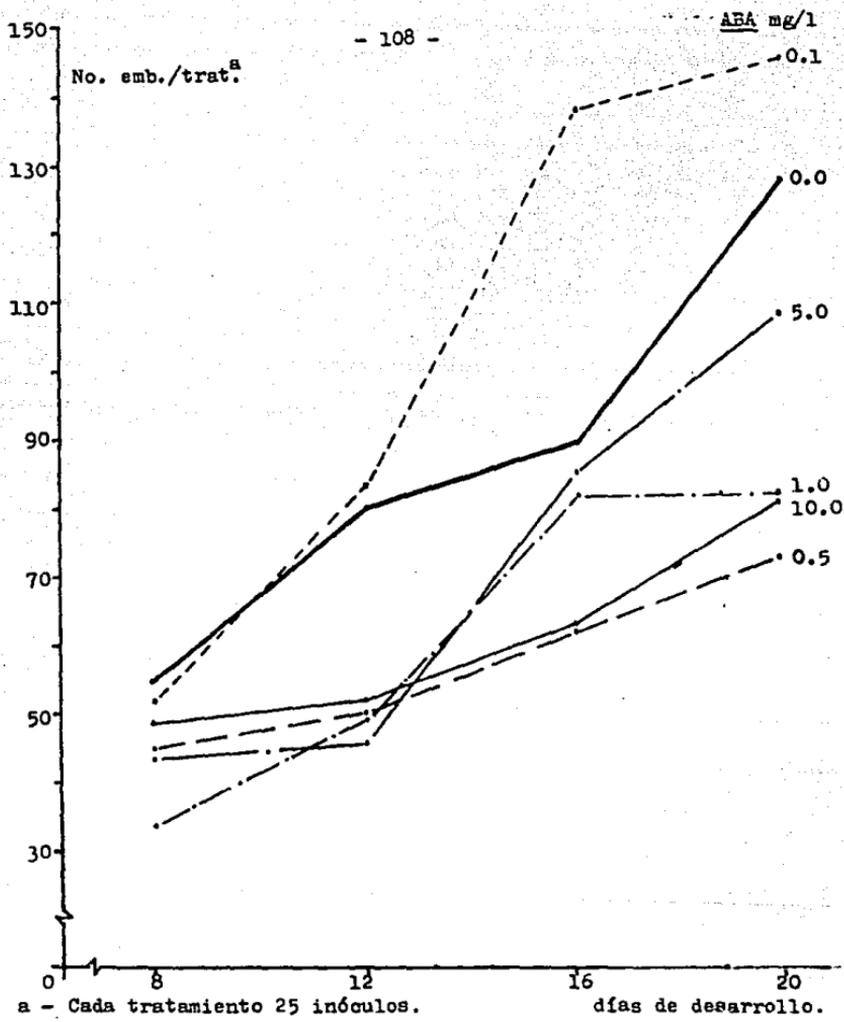
Cuadro 9.- Respuesta, rendimiento y germinación de embriones somáticos de alfalfa A 70.34 por efecto de 1.75 g/l de casaminoácidos, aplicados en la inducción y desarrollo de los embriones.

Tratamiento		Respuesta	Rendimiento	Germinación
Medio de Inducción (15 días)	Medio de Desarrollo (25 días)	(%)	(\bar{x})	en medio MS basal al 50% (%)
SIN Casaminoácidos	SIN Casaminoácidos	89.0	9.3 ± 6.5	37.0
SIN Casaminoácidos	CON Casaminoácidos	92.8	16.6 ± 9.3	41.8
CON Casaminoácidos	CON Casaminoácidos	89.2	19.5 ± 8.4	43.0
CON Casaminoácidos	SIN Casaminoácidos	93.7	12.0 ± 7.4	33.3

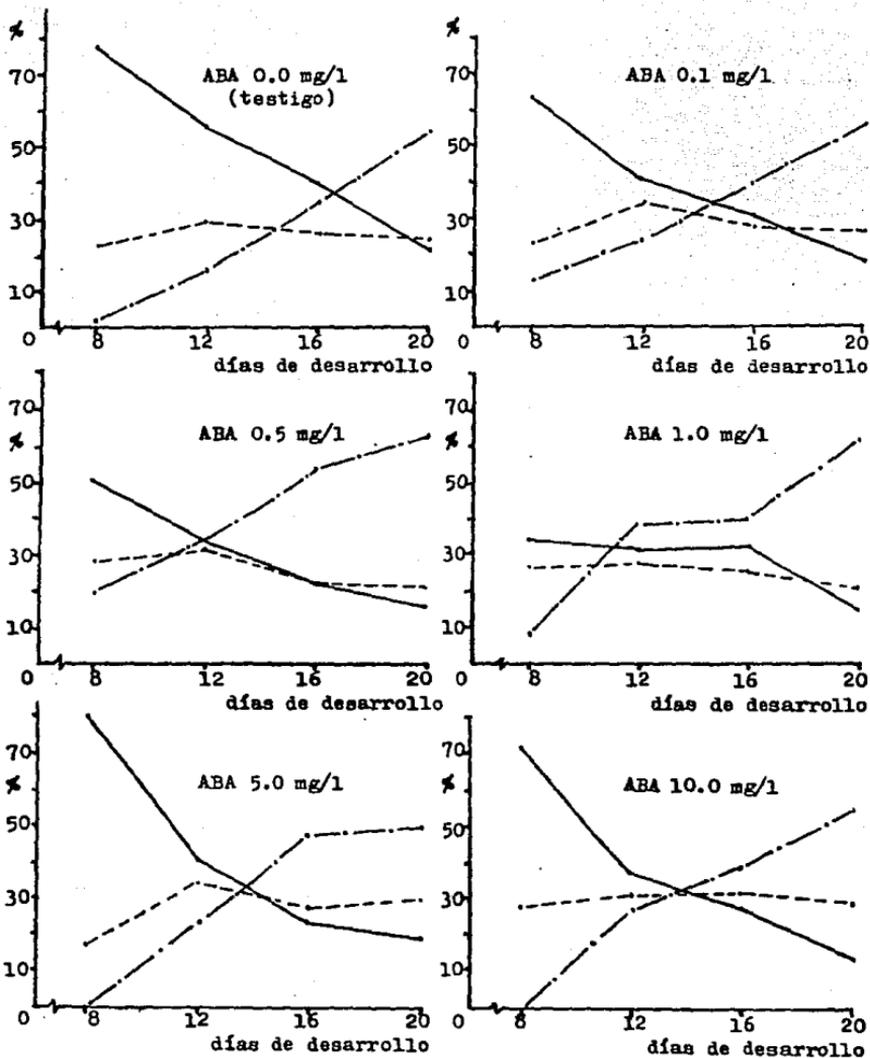
B.4. Efecto del ácido abscísico (ABA) en el desarrollo de embriones somáticos de alfalfa A 70.34.

Una característica de la embriogénesis somática in vitro es la asincronía de las etapas de desarrollo (Zee y Wu, 1979; Dos Santos et al., 1983; Sung et al., 1984), los sistemas de apio, alfalfa A 70.34 y Fl.1 no son la excepción, diferentes métodos pueden ser aplicados para la selección de embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo (Loschiavo, 1984), los métodos incluyen separaciones físicas (filtración o centrifugación en gradientes de densidad), o el uso de algún compuesto químico que logre sincronía. En alfalfa A 70.34 se probó el efecto del ácido abscísico (ABA) en la producción de embriones somáticos y se analizó el grado de sincronía durante el desarrollo y en el momento del rescate de los embriones somáticos, relacionando estos resultados con el rendimiento, la respuesta y los porcentajes de germinación.

En la gráfica 7, se observa que la producción de embriones somáticos en la mayoría de los tratamientos con ABA fue menor que el testigo (sin ABA). No obstante en la gráfica 8, donde se aprecia el comportamiento de las etapas de embriogénesis globular, co razón y torpedo durante su desarrollo, se observa que los tratamientos con ABA 0.5 y 1.0 mg/l producen una mayor separación de estas etapas de desarrollo en el tiempo, con lo que se obtuvo más del 60 % de embriones en estado de torpedo al momento de rescate (trasplante a medio de germinación), en comparación con el control sin ABA, donde el porcentaje de embriones en estado de torpedo es del 54 %. A una concentración de 10 mg/l de ABA se obtuvieron muchos embriones anormales y la separación de las



Gráfica 7.- Producción y desarrollo de embriones somáticos de alfalfa A 70.34 con diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA), en el medio de desarrollo.



Gráfica 8.- Efecto de ácido abscísico (ABA) en los porcentajes de etapas de desarrollo globular (—), corazón (---) y torpedo (-·-·) de embriones somáticos de alfalfa A 70.34.

etapas de desarrollo ya no es tan eficiente. En la figura 4, se puede observar que la mayor separación de fases de desarrollo ocurre con ABA a concentraciones de 0.1 - 1.0 mg/l, al final del desarrollo de los embriones somáticos.

Sin embargo, la germinación es otro punto importante a considerar. El cuadro 10 resume los resultados de germinación de embriones somáticos desarrollados en presencia de los diferentes tratamientos con ABA, en general los porcentajes de germinación son muy similares, pero la germinación se retardó en relación a otros experimentos, en el momento de evaluación (día 30 en medio de germinación); las plántulas apenas habían alcanzado una altura de 4-6 cm, mientras que los controles tenían plántulas de hasta 10 cm.

Aún cuando no se aprecia gran diferencia (cuadro 10), el rendimiento disminuye cuando aumenta la concentración de ABA en el medio de desarrollo, resultados similares se obtuvieron en la respuesta de embriogénesis.

En un cultivo de embriogénesis somática in vitro, el ácido abscísico tiene diferentes efectos: retarda o inhibe la germinación, detiene la formación de embriones secundarios (aumento de sincronía), e incluso con adecuados pulsos es posible obtener embriones más normales (Ammirato, 1987). En la gráfica 8 se observa que la separación de las etapas de desarrollo se lleva a cabo en los últimos días del desarrollo, lo que indica que el ácido abscísico puede ser aplicado en pulsos cortos, unos días antes del rescate de los embriones, para evitar la continua acción del ABA durante todo el desarrollo de los embriones. Un experimento muy interesante sería observar la síntesis de proteínas de reserva por efecto de diferentes pulsos con ABA durante el desarrollo

Cuadro 10.- Respuesta, rendimiento y germinación de embriones somáticos de alfalfa A 70.34, en diferentes tratamientos con ácido abscisico (ABA), aplicados al medio de desarrollo.

ABA (mg/l)	Respuesta (%)	Rendimiento (\bar{x})	Germinación (%)
0.0	80.0	6.0 \pm 3.5	37.0
0.1	83.3	6.0 \pm 3.7	26.0
0.5	60.0	5.0 \pm 3.0	37.0
1.0	73.3	4.0 \pm 2.7	26.0
5.0	62.9	6.0 \pm 5.3	25.0
10.0	57.1	4.0 \pm 2.8	20.0

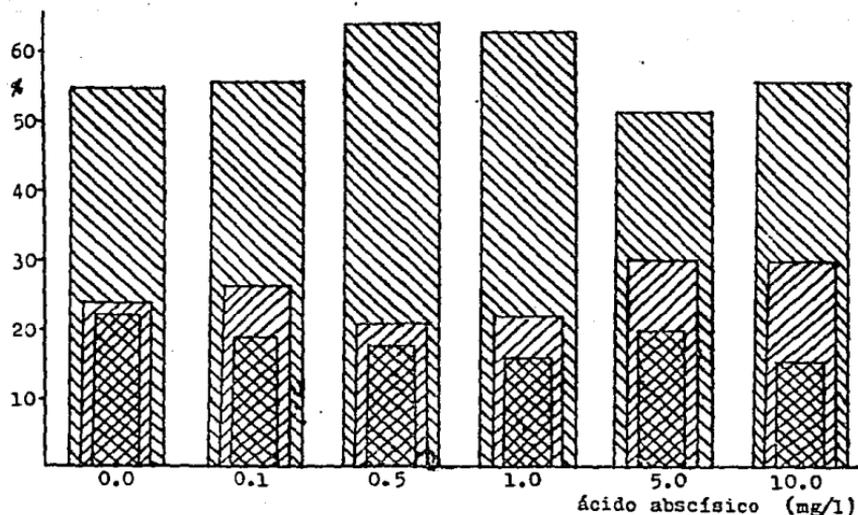


Figura 4.- Porcentajes de embriones somáticos de alfalfa A 70.34 globular (■), corazón (▨) y torpedo (▧), al final de su desarrollo en diferentes tratamientos con ácido abscisico.

de los embriones somáticos de alfalfa.

B.5. Germinación de embriones somáticos de alfalfa.

En la germinación de embriones somáticos de alfalfa A 70.34 con diferentes medios basales, el mayor porcentaje de germinación (44.6 %), se obtuvo con el medio MS al 50 % (cuadro 11), el medio SH (usado en el protocolo original) alcanzó un porcentaje de germinación de 23.7 %. Los más bajos porcentajes de germinación fueron obtenidos con los tratamientos en medio B₅, sin embargo se observó algo importante: embriones en estado globular y corazón sembrados en medio B₅ al 100 %, terminaron su desarrollo hasta embriones maduros, en cambio la mayoría de los embriones en estado globular y corazón sembrados en los otros medios (MS o SH), fueron incapaces de terminar su desarrollo, de aquí se desprende que el medio B₅ sin reguladores del crecimiento es un buen medio para el desarrollo de embriones somáticos hasta su maduración y que la conversión de embriones somáticos de alfalfa A 70.34 es mayor en el medio MS al 50 %.

Por lo general la conversión de embriones somáticos se lleva a cabo en medios basales sin reguladores del crecimiento, no obstante algunos autores (Walker y Sato, 1981; Brown y Atanassov, 1985), incluyen en sus protocolos el uso de reguladores del crecimiento para la germinación de embriones somáticos; en el presente trabajo, usando el medio MS al 50 %, se probó el efecto de diferentes reguladores del crecimiento, en la conversión de embriones somáticos de alfalfa A 70.34.

En el cuadro 12, se observa que a una concentración de 0.01 mg/l de ácido giberélico (GA₃), hay un sensible aumento en el

Cuadro 11.- Porcentajes de germinación de embriones somáticos de alfalfa A 70.34 en 3 medios basales y a 3 concentraciones

Medio basal	Concentración		
	100 %	50 %	25 %
MS	29.8 %	44.6 %	33.3 %
B ₅ ^e	8.3 %	1.0 %	11.2 %
SH	23.7 %	23.0 %	15.2 %

MS - Murashige y Skoog (1962).

B₅^e - Villegas y Brown (1987), modificado de Gamborg et al. (1968).

SH - Schenk y Hildebrandt (1972).

Cuadro 12.- Porcentajes de germinación de embriones somáticos de alfalfa A 70.34 en medio MS basal al 50 %, en presencia de 4 reguladores del crecimiento a 3 concentraciones.

Regulador del crecimiento ^a	Concentración (mg/l)		
	0.01	0.1	1.0
Acido indolacético (AIA)	48.1 %	43.6 %	31.5 %
Acido giberélico (GA ₃)	57.8 %	40.8 %	40.8 %
Acido indolbutírico (AIB)	41.0 %	39.2 %	37.5 %
Bencil aminopurina (BAP)	42.8 %	28.3 %	10.9 %

a - Testigo; Germinación en medio MS basal al 50 % sin reguladores = 41.8 %.

porcentaje de germinación de embriones somáticos (57.8 %), esta frecuencia de conversión fue la más alta en embriones somáticos de alfalfa A 70.34. Walker y Sato (1981), proponen en su estudio el uso de 10 mg/l de GA_3 para la conversión de embriones somáticos de alfalfa, en nuestro caso con 1.0 mg/l de GA_3 se obtuvo un porcentaje de germinación de 40.8 %, a 10.0 μ g/l la germinación probablemente hubiera sido menor. En el mismo cuadro se observa que el más bajo porcentaje de conversión (10.9 %), se obtuvo con 1.0 mg/l de BAP lo cual es lógico, al ser una citocinina, uno de sus principales efectos es la elongación de brotes y yemas y comúnmente no es utilizada para la germinación de embriones somáticos, con BAP se observó incluso la inducción de callo en los embriones somáticos, principalmente a 1.0 mg/l.

Con respecto al ácido indolbutírico, los porcentajes de conversión no son significativamente diferentes al control, aunque es de notar que a 1.0 mg/l de AIB empieza a producirse callo, aunque en menor cantidad que con BAP.

La frecuencia de conversión de embriones somáticos de alfalfa es buena, si se la compara con la obtenida por Redenbaugh et al. (1986). En sus primeros estudios de conversión de embriones somáticos de alfalfa encapsulados y no encapsulados, Redenbaugh y col. obtienen porcentajes de conversión de alrededor del 30 %. En el presente estudio una alternativa para la encapsulación de embriones somáticos de alfalfa es seleccionar los embriones de mejor morfología y los que tengan un mayor contenido de proteínas de reserva, ya que en todos los experimentos de germinación se utilizaron embriones escogidos al azar, únicamente que tuvieran un tamaño de 2 a 4 mm y que estuvieran en estado de --torpedo.

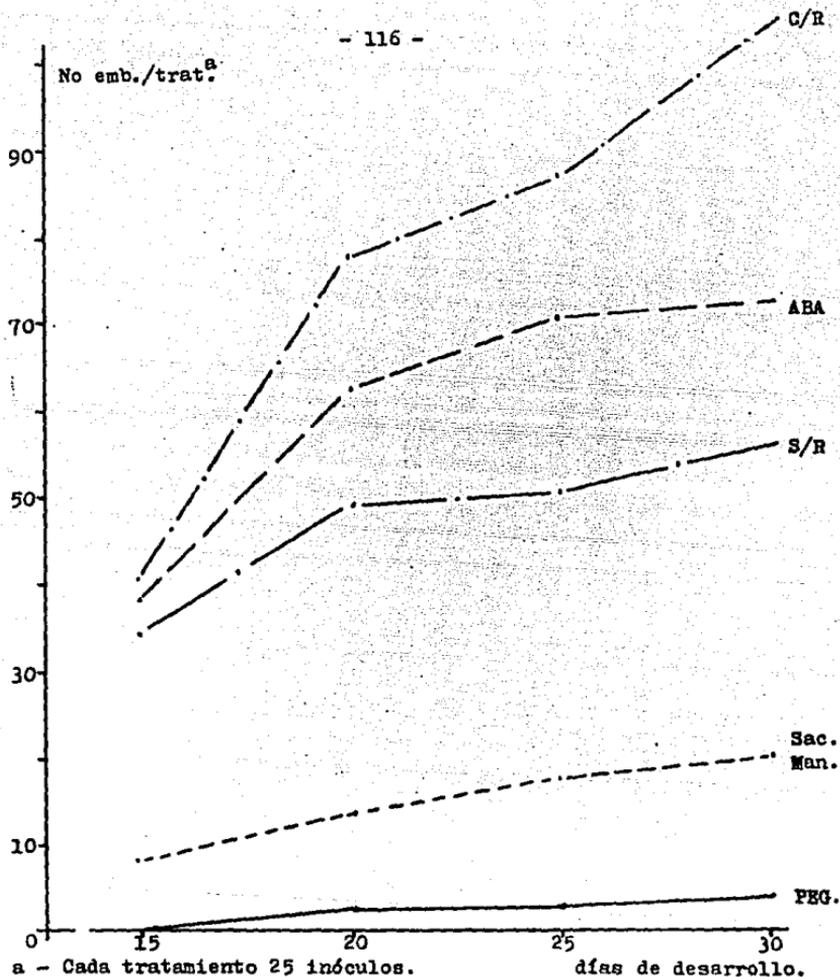
C. EFECTO DE DIFERENTES TIPOS DE STRESS DURANTE EL DESARROLLO DE EMBRIONES SOMATICOS DE ALFALFA A 70.34 Y Fl.1.

Con la aplicación de diferentes tipos de "stress" (disminución de la fuente de carbono, desarrollo en completa oscuridad, disminución del contenido de humedad con polietilenglicol, acción del ácido abscísico, etc.), durante el desarrollo de embriones somáticos de alfalfa A 70.34 y Fl.1, se observaron interesantes resultados:

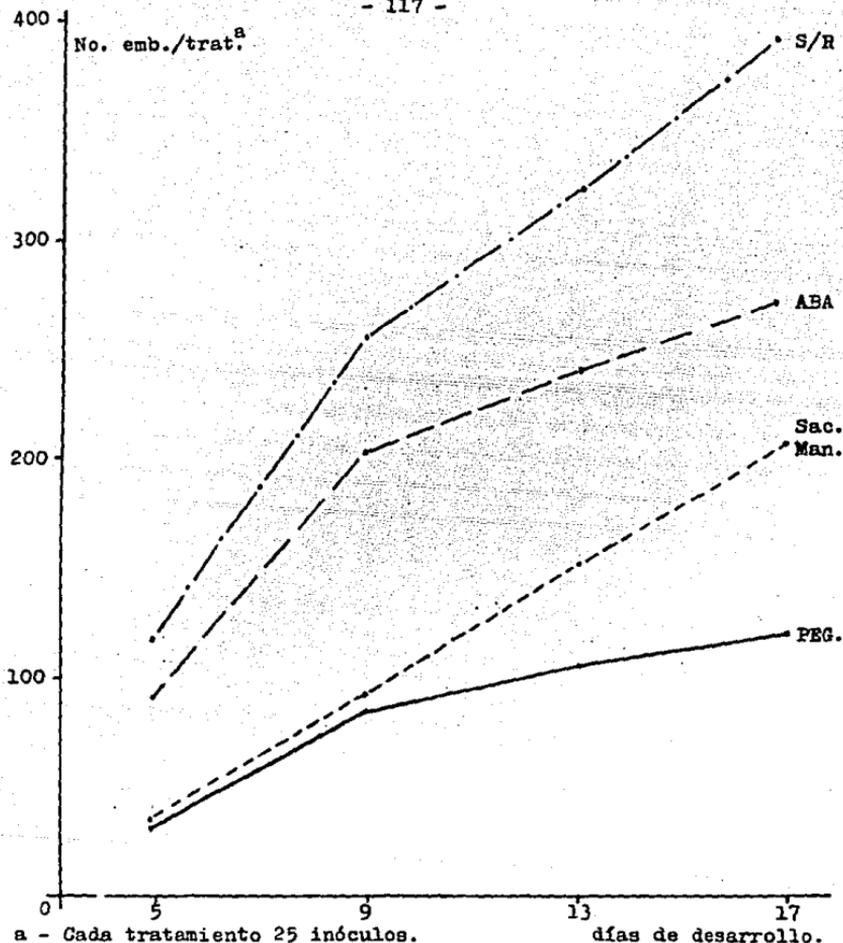
En alfalfa A 70.34 y Fl.1, los testigos (sin "stress"), tienen una mayor producción de embriones somáticos (gráficas 9 y 10). Como era de esperarse, la aplicación de algún "stress" disminuye la cantidad de embriones somáticos obtenidos, los tratamientos más fuertes como, la reducción en la fuente de carbono, el "stress" por agua y la aplicación de todos los tratamientos juntos, produjeron los rendimientos más bajos.

La respuesta y rendimiento de alfalfa A 70.34 (cuadro 13), es menor que en Fl.1 (cuadro 14), en este experimento apenas se iniciaban los ciclos de selección recurrente en alfalfa A 70.34, como ha sido reportado por Brown y Atanassov (1985) y (1987), la alfalfa Fl.1 al ser una línea proveniente de M. falcata, tiene altas respuestas embriogénicas, aún sin selección recurrente.

Como se observa en el cuadro 14, la respuesta en embriogénesis en los tratamientos con ácido abscísico, sacarosa-manitol y el testigo sin reguladores de alfalfa Fl.1, es mayor al 90 %, aunque es de notar que los rendimientos de los diferentes tratamientos es menor que el testigo. De igual forma en alfalfa A 70.34, se observa (cuadro 13), que en la mayoría de los trata



Gráfica 9.- Producción de embriones somáticos en alfalfa A 70.34, aplicando tratamientos con: polietilenglicol al 10% (—), ácido abscísico 0.5 mg/l (— —), 33% sacarosa-66% manitol (----), sin reguladores (—) y con reguladores (— · —), en el medio de desarrollo.



Gráfica 10.- Producción de embriones somáticos de alfalfa Fl.1, aplicando tratamientos con: ácido abscísico 0.5 mg/l (— —), sin reguladores (— · — ·), 33% sacarosa-66% manitol (----) y polietilenglicol al 10% (— — — —), en el medio de desarrollo.

Cuadro 13.- Respuesta, rendimiento, contenido de proteínas albúminas y globulinas y germinación de embriones somáticos de alfalfa A 70.34, desarrollados en diferentes tipos de "stress".

Tratamiento	Respuesta ^a	Rendimiento ^b	Alb.	Glob.	Germinación
	(%)	(\bar{x})	(mg prot./g p.f.)		(%)
Sin reguladores	46.0	5.0 ± 3.3	7.7	11.6	23.0
Con reguladores	43.5	5.0 ± 3.2	2.3	2.7	26.0
Acido abscísico 0.5 mg/l	46.0	5.0 ± 4.4	14.7	6.1	24.0
Sacarosa 33 % Manitol 66 %	41.0	2.0 ± 1.7	1.1	5.6	23.0
Poliethylenglicol 1000 al 10 %	7.0	2.0 ± 1.4	--	--	--
Obscuridad	42.0	5.0 ± 4.1	14.8	7.6	22.0
Tratamientos III a VI juntos	0.0	0.0 ± 0.0	--	--	--

a - Respuesta; Número de callos con embriones/número de callos.

b - Rendimiento; Promedio del número de embriones/callos.

-- Insuficiente cantidad de embriones para la determinación.

Cuadro 14.- Respuesta, rendimiento, contenido de proteínas albúmi-
nas y globulinas y germinación de embriones somáticos
de alfalfa Fl.1, desarrollados en diferentes tipos
de "stress".

Tratamiento	Respuesta ^a (%)	Rendimiento ^b (\bar{x})	Alb.	Glob.	Germinación (%)
			(mg prot./g p.f.)		
Sin reguladores	93.0	15.0 ± 9.2	15.0	7.0	43.0
Con reguladores	0.0	0.0 ± 0.0	0.0	0.0	0.0
Acido abscísico 0.5 mg/l	96.0	10.0 ± 4.7	22.0	1.5	33.0
Sacarosa 33 % Manitol 66 %	96.0	8.0 ± 3.2	12.0	4.3	17.0
Poliethylenglicol 1000 10%	73.0	6.0 ± 3.5	--	4.8	--
Obscuridad	85.0	9.0 ± 4.4	30.0	8.6	31.0
Tratamientos III a VI juntos	16.0	2.0 ± 0.8	25.0	4.0	--

a - Respuesta; Número de callos con embriones/número de callos.

b - Rendimiento; Promedio del número de embriones/callos.

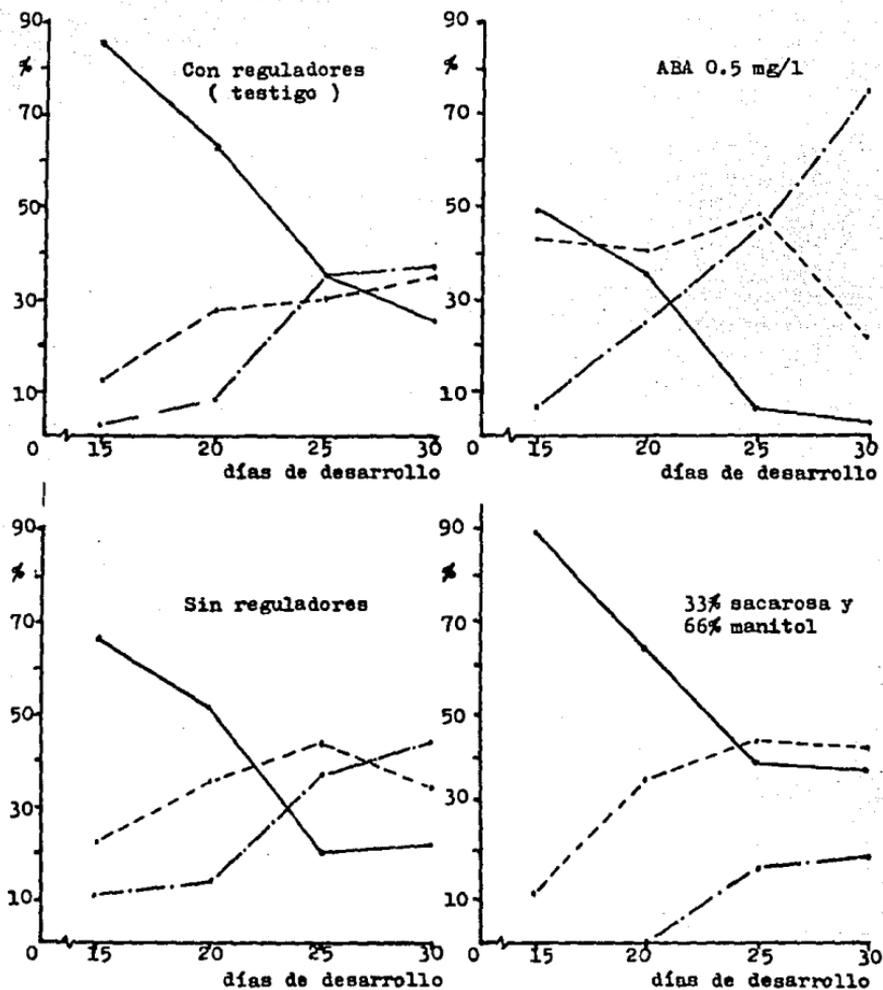
-- Insuficiente cantidad de embriones para la determinación.

mientos la respuesta es similar, entre 40 y 50 %, pero el rendimiento es menor en los tratamientos con "stress" más fuertes, de aquí se concluye que la aplicación de algún "stress" en general no tiene efecto sobre la respuesta en embriogénesis de alfalfa A 70.34 y Fl.1, pero sí disminuyen sensiblemente los rendimientos.

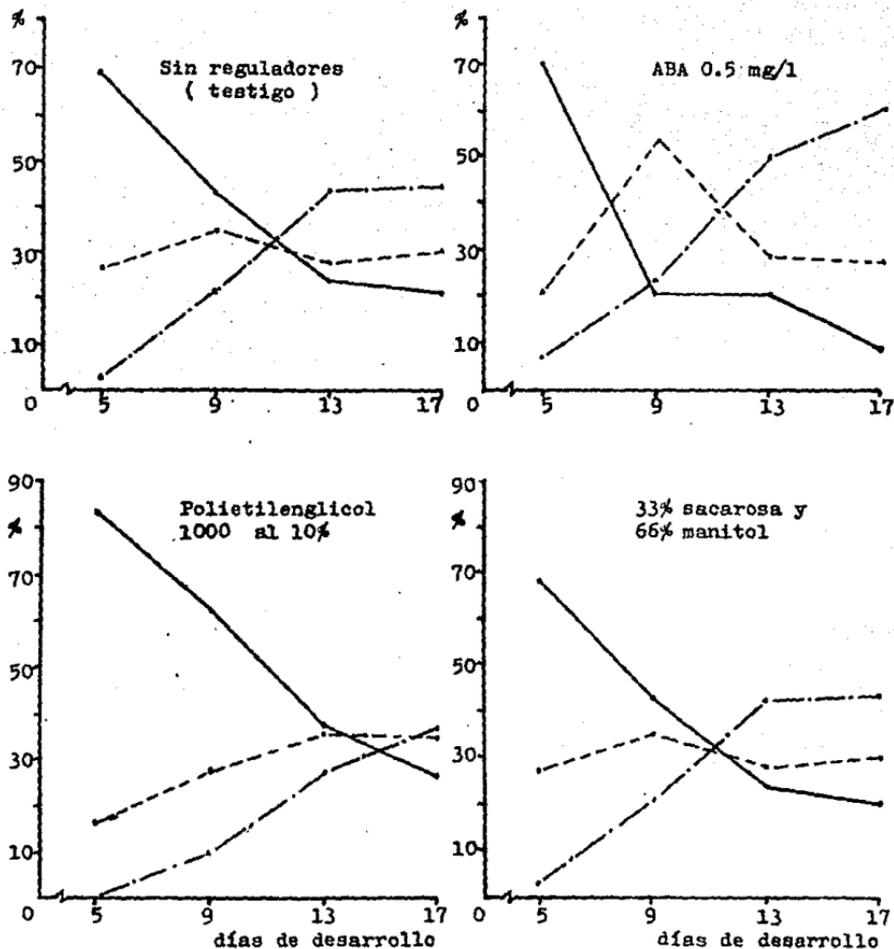
En alfalfa Fl.1, se encontró que la completa diferenciación de los embriones somáticos necesita de un medio sin reguladores del crecimiento, después de 10 - 12 días de inducción se observó una gran cantidad de proembriones y embriones globulares en callos provenientes de pecíolos de plántulas, sin embargo ninguno es capaz de llegar al estado torpedo si se mantiene en este medio, además después de estar 30 días en inducción los embriones degeneran a menos que se eliminen los reguladores del medio de cultivo (transfiriendo los callos a medio de desarrollo), antes del día 25 de la inducción.

En este experimento, de los tratamientos probados el ABA a 0.5 mg/l fue el único que logró mayor sincronía en las etapas de desarrollo de alfalfa A 70.34 y Fl.1 (gráficas 11 y 12), se observa que en los tratamientos con polietilenglicol y sacarosa-manitol los embriones torpedo tardaron más tiempo en aparecer. El bajo rendimiento de los diferentes tipos de "stress" combinados - impidió incluir gráficas de este tipo, por la misma razón en el tratamiento con polietilenglicol en alfalfa A 70.34, no pudo ser graficado.

Los embriones que tuvieron su desarrollo todo el tiempo en obscuridad, al momento de ser rescatados no presentaron el característico color verde de los demás embriones, sino un color cremoso, aún así el rendimiento obtenido fue de los más altos tanto en alfalfa Fl.1 como en A 70.34 (cuadro 14 y 13), la sincroniza



Gráfica 11.- Desarrollo de embriones somáticos globular (—), cornu zón (----) y torpedo (-.-.-), de alfalfa A 70.34 en diferentes tratamientos aplicados al medio de desarrollo.



Gráfica 12.- Desarrollo de embriones somáticos globular (—), cora-
zón (---) y torpedo (-.-) de alfalfa Fl.1, en dife-
rentes tratamientos aplicados al medio de desarrollo.

ción obtenida al momento del rescate (figura 5), fue la mayor con excepción del tratamiento con ABA, con respecto al contenido de proteínas, también fue de los más altos y en la germinación, este tratamiento produjo plántulas normales, por lo tanto puede decirse que los tratamientos con oscuridad y ABA: aumentan el grado de sincronía de las etapas de desarrollo, incrementan la síntesis de proteínas de reserva en los embriones somáticos y la conversión de embriones produce plántulas normales.

De acuerdo a la figura 5, los mejores tratamientos para ob tener mayor sincronía al momento del rescate de los embriones so máticos de alfalfa A 70.34 y Fl.1, es cuando el desarrollo de los embriones se llevó a cabo en presencia de ácido abscísico 0.5 mg/l o en oscuridad, mezclas de estadios se observaron en los demás tratamientos.

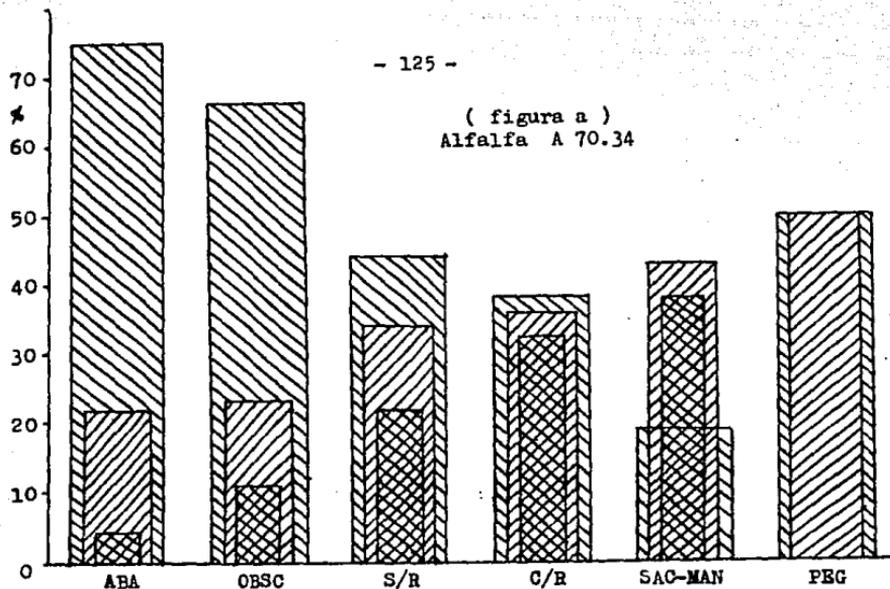
D. ANALISIS DE PROTEINAS DE RESERVA 7 S Y 11 S.

En alfalfa A 70.34, el análisis de proteínas muestra que los tratamientos con ácido abscísico y oscuridad tienen los mayores contenidos de proteínas (determinación por el método Bradford), en comparación cuando el desarrollo de los embriones fue en continua presencia de reguladores del recimiento (cuadro 13). De igual forma en alfalfa Fl.1 la mayor cantidad de proteínas determinada fue en los mismos tratamientos (cuadro 14).

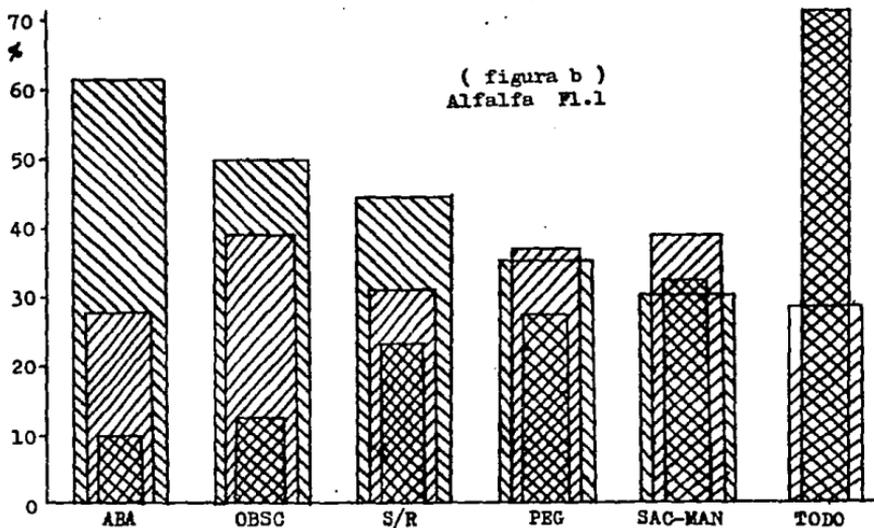
Por otro lado el análisis electroforético demostró que prácticamente en todos los tratamientos hay presencia de proteínas - de reserva 7 S y 11 S y que el patrón determinado corresponde con el de proteínas de semillas.

Figura 5.- Porcentajes de embriones somáticos de alfalfa A 70.34 (figura a) y Fl.1 (figura b), en estado globular (), corazón () y torpedo (), al final de su desarrollo en diferentes tipos de "stress": [ácido abscísico 0.5 mg/l (ABA); completa oscuridad (OBSC); sin reguladores (S/R); con polietilenglicol al 10 % (PEG); sacarosa 33 % - manitol 66 % (SAC-MAN); - con reguladores (C/R) y con todos los anteriores tratamientos (TODO)].

(figura a)
Alfalfa A 70.34



(figura b)
Alfalfa Fl.1



En el experimento de separación de fases de inducción y desarrollo en el proceso de embriogénesis de alfalfa A 70.34, cuando el trasplante de los inóculos de medio de inducción con reguladores a medio de desarrollo sin reguladores fue a los días 15 y 21, se obtuvieron los geles de poliacrilamida con bandas de proteínas más intensas (figura 6), lo que indica un mayor contenido de proteínas y por lo tanto mayor calidad de los embriones.

Un punto importante es que en algunos geles de poliacrilamida se observó que en la fracción de albúminas proveniente de embriones somáticos, se encontraban bandas características de proteínas de reserva 7 S y 11 S (fracción de globulinas), lo que podía indicar una posible mezcla de muestras, sin embargo la consistencia de este resultado plantea otras posibilidades, una de ellas es que las proteínas de reserva 7 S (Vicilina) y 11 S (legumina), no alcanzan a ensamblarse para formar su estructura terciaria y cuaternaria. la búsqueda de cuerpos proteicos por microscopía electrónica, podría comprobar o refutar esta hipótesis.

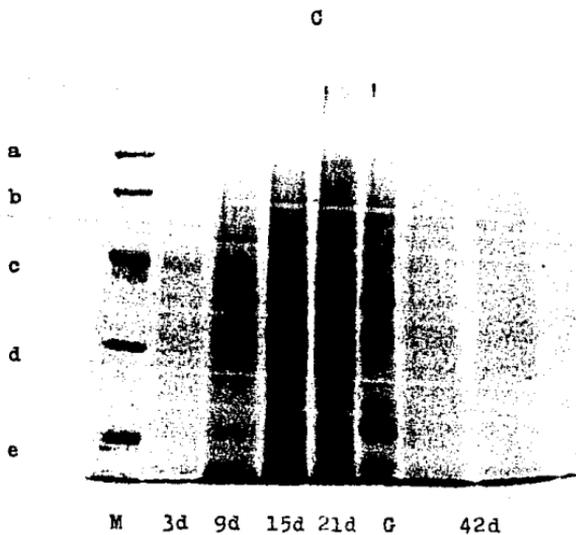
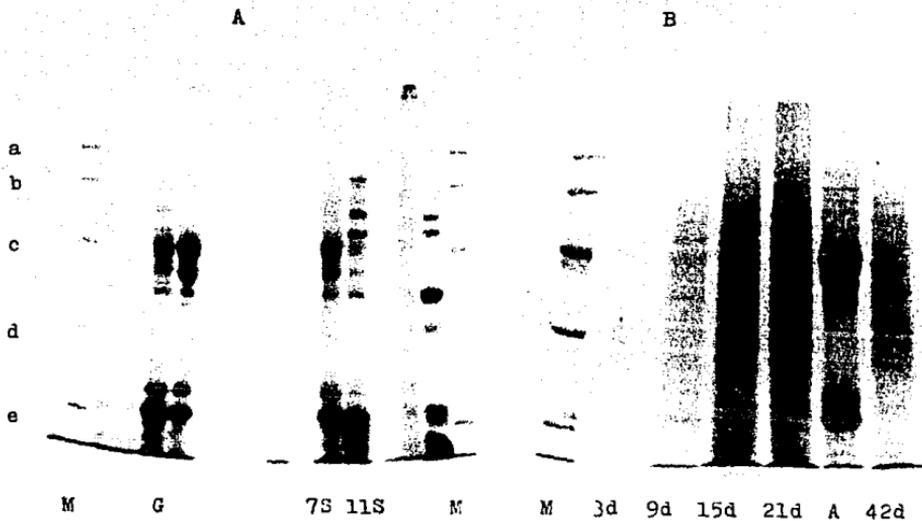
De los diferentes geles de poliacrilamida, las bandas con proteínas de reserva que presentaron mayor intensidad fue en los tratamientos con ABA y oscuridad, lo que indica que las condiciones de "stress" obligan al embrión somático en desarrollo a tener una tasa de síntesis de proteínas de reserva mayor.

Actualmente como resultado del uso de técnicas de Biología - Molecular, se tiene determinada la secuencia de aminoácidos de proteínas de reserva de semillas de varias especies, entre ellas; chícharo y frijol (Slighon y Chee, 1987). La tendencia es: - buscar sitios en las proteínas de reserva 7 S y 11 S, que puedan tolerar variación en la secuencia de aminoácidos.

Combinando los conocimientos en proteínas de reserva de la -

Figura 6.- Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.

- A) Fracciones de proteínas globulinas (G), 7 S y 11 S de semillas de alfalfa A 70.34. Marcadores de peso molecular (M): a - fosforilasa B (95.2 Kd), b - albúmina de suero bovino (66.2 Kd), c - ovoalbúmina (45.0 Kd), d - anhidrasa carbónica (31.0 Kd), e - inhibidor de tripsina (21.5 Kd) y f - lisosima (14.4 Kd).
- B) Fracción de albúminas de embriones somáticos de alfalfa A 70.34, desarrollados en diferentes tiempos de inducción 3 días (3d), 9 días (9d), 15 días (15d), 21 días (21d) y 42 días (42d) con reguladores del crecimiento y posterior trasplante a medio sin reguladores, albúminas de semilla (A).
- C) Fracción de globulinas de embriones somáticos de alfalfa A 70.34, desarrollados en diferentes tiempos de inducción 3 días (3d), 9 días (9d), 15 días (15d), 21 días (21d) y 42 días (42d) con reguladores del crecimiento y posterior trasplante a medio sin reguladores, globulinas de semilla (G).



embriogénesis sexual y somática, con los recientes avances en -
tecnología de transferencia de genes vegetales, se podrán corre-
gir deficiencias en aminoácidos con azufre, que son inherentes a
proteínas de reserva de semillas leguminosas, lo que beneficiaría
la dieta humana y animal.

E. DESARROLLO DE LA MATRIZ DE ENCAPSULACION PARA EMBRIONES SOMATICOS.

La inmovilización y confinamiento de material biológico (en zimas, organelos, células animales y vegetales, microorganismos, insectos, etc.), ha sido un procedimiento utilizado ampliamente (Kierstan y Bucker, 1977; Grisby y Hall, 1980; Matteau y Saddler, 1982; Fravel et al., 1985), para facilitar el manejo del material y para otros objetivos específicos; ya sea dar estabilidad, obtener metabolitos o desarrollar nuevas técnicas de producción, como es el caso del atrapamiento de células vegetales.

Las técnicas de inmovilización incluyen el uso de diferentes polímeros (quitosanas, agar, agarosa, alginatos, carragenina, po liacrilamida, poliuretano, etc.).

Para la encapsulación de embriones somáticos Redenbaugh et al., (1986), probaron diferentes hidrogeles naturales, adaptando la metodología de inmovilización de células vegetales para encapsular embriones somáticos. Los soportes que necesitaran condiciones muy fuertes para su producción (calor o solventes), o que fueran tóxicos para embriones somáticos, fueron descartados para usarse como matriz de encapsulación. Encontraron que los algina tos son los mejores soportes para encapsular embriones somáticos, por su facilidad de manejo, gelificación en ausencia de calor y porque producen esferas de gel con una consistencia adecuada para su manejo.

Un soporte que prácticamente no ha sido utilizado para inmovilizar material biológico es el ácido poligalacturónico, el gel nos fue proporcionado por el Dr. Magaña del CINVESTAV Zacatenco, México. (Magaña, ha reportado mejores resultados en la inmovili

zación de células de levadura con ácido poligalacturónico, que con alginato).

En el presente estudio se probaron dos tipos de soporte; alginato y ácido poligalacturónico (PGA) o pectinato. Se observaron y cuantificaron diferentes características en la obtención de cápsulas de gel a partir de 3 tipos de alginato y uno de pectinato.

En alginato de baja viscosidad (250 cps), los resultados de producción de cápsulas se presentan en el cuadro 15. Con una concentración de alginato de sodio de 0.5 % no fue posible obtener cápsulas de gel a ninguna concentración de cloruro de calcio, a una concentración de 12.5 mM de CaCl_2 , tampoco fue posible obtener cápsulas a ninguna de las concentraciones de alginato probadas. La obtención de cápsulas de alginato, de tamaño adecuado para encapsular embriones somáticos con alginato de baja viscosidad sólo se da a altas concentraciones de gel y cloruro de calcio, asimismo a bajas concentraciones de gel y agente de complejación, se obtienen cápsulas amorfas, por otro lado con este gel el tiempo de complejación para que las cápsulas tengan una consistencia adecuada, es mayor que en otros tipos de alginato, se necesitan de 30 a 45 minutos de complejación para formar esferas adecuadas, para manejarlas como matriz de encapsulación de embriones somáticos.

En alginato de viscosidad media (3500 cps), la concentración mínima de CaCl_2 para formar cápsulas en forma de esfera fue a 25 mM, a concentraciones de 50 y 100 mM hubo buena formación de esferas, junto con una concentración de alginato de sodio entre - 1.0 y 1.5 %. En el cuadro 16, se aprecia que a medida que aumenta la concentración de alginato aumenta el tamaño y peso de -

Cuadro 15.- Producción de cápsulas de alginato de calcio, a partir de alginato de sodio de baja viscosidad (250 cps) y cloruro de calcio a diferentes concentraciones.

CaCl ₂ (mM)	Alginato de sodio de baja viscosidad (250 cps)											
	0.5 %			1.0 %			1.5 %			2.0 %		
	P.	T.	F.	P.	T.	F.	P.	T.	F.	P.	T.	F.
12.5	62.8	--	A	77.3	--	A	123.0	--	A	145.0	--	A
25.0	39.6	--	A	56.0	--	A	75.0	--	A	70.4	4.9	G
50.0	62.8	--	A	42.9	3.6	G	56.8	4.2	G	57.9	4.5	EO
100.0	63.7	--	A	41.8	3.6	G	50.0	4.2	EO	54.2	4.3	E
200.0	79.6	--	A	43.9	3.9	G	51.0	4.0	E	56.1	4.0	E

P. - peso (mg), T. - tamaño (mm), F. - forma (A - amorfa, G - gota, EO - esfera ovalada, E - esfera), -- - No fue posible determinar.

las esferas obtenidas, de igual forma a medida que aumenta la concentración de cloruro de calcio disminuye el tamaño y peso de las cápsulas, así las cápsulas de menor tamaño y peso (3.2 mm y 27.7 mg), fueron formadas con alginato de sodio al 0.5 % y CaCl₂ 200 - mM y las de mayor tamaño y peso (7.0 mm y 190.3 mg) a 2.0 % de alginato y 12.5 mM de CaCl₂. La forma de las cápsulas es esférica en un intervalo de concentraciones de alginato de sodio 1.0 a 1.5% y cloruro de calcio 50 a 200 mM, asimismo la consistencia de cápsulas formadas con alginato de viscosidad media, determinada manualmente, mostró ser la mayor en los tres tipos de alginato, empleados en la presente investigación.

Cuadro 16.- Producción de cápsulas de alginato de calcio a partir de alginato de sodio de viscosidad media (3500 cps) y cloruro de calcio a diferentes concentraciones.

CaCl ₂ (mM)	Alginato de sodio de viscosidad media (3500 cps)											
	0.5 %			1.0 %			1.5 %			2.0 %		
	P.	T.	F.	P.	T.	F.	P.	T.	F.	P.	T.	F.
12.5	58.8	—	A	81.6	4.6	G	118.5	5.9	G	190.3	7.0	G
25.0	46.1	—	A	52.6	4.4	G	62.8	5.3	E	185.8	6.7	EO
50.0	34.1	—	A	41.2	4.0	E	49.1	4.4	E	87.3	5.3	EO
100.0	31.6	3.5	G	37.0	3.7	E	44.0	4.0	E	79.6	4.9	E
200.0	27.2	3.2	E	32.6	3.4	E	40.1	3.8	E	68.3	4.4	E

P. - peso (mg), T. - tamaño (mm), F. - forma (A - amorfa, G - gota, EO - esfera ovalada, E - esfera), — - No fue posible determinar.

En alginato de alta viscosidad (14000 cps), el intervalo de concentraciones de alginato para formar cápsulas es más estrecho (cuadro 17), a 0.5 % de alginato de sodio no se produjeron esfe ras en ninguna concentración de CaCl₂ y a 2.0 % la excesiva visco sidad del gel, impidió la formación de cápsulas con el procedi— miento probado, e concentraciones de 1.0 y 1.5 % de alginato, el tamaño y peso de las cápsulas siguieron el comportamiento observa— do en las cápsulas de alginato de viscosidad media, es decir, dis minución en el peso y tamaño de las cápsulas al aumentar la concen— tración del agente de complejación.

Con este tipo de alginato, se obtuvieron las cápsulas de mayor

peso, sin embargo la consistencia, determinada manualmente fue la más baja de los tres tipos de alginato, probablemente el mayor peso molecular del polisacárido impide la formación de un gel de alginato de calcio más estable.

Cuadro 17.- Producción de cápsulas de alginato de calcio a partir de alginato de sodio de alta viscosidad (14000 cps) y cloruro de calcio a diferentes concentraciones.

CaCl ₂ (mM)	Alginato de sodio de alta viscosidad (14000 cps)											
	0.5 %			1.0 %			1.5 %			2.0 %		
	P.	T.	F.	P.	T.	F.	P.	T.	F.	P.	T.	F.
12.5	78.0	--	A	155.9	6.1	G	208.1	6.4	G	--	--	--
25.0	61.5	--	A	105.0	5.6	G	154.7	6.1	G	--	--	--
50.0	51.0	--	A	84.6	4.8	G	126.6	5.5	G	--	--	--
100.0	48.5	--	A	73.9	4.4	EO	108.6	5.1	EO	--	--	--
200.0	49.5	--	A	67.4	4.3	EO	106.9	4.9	E	--	--	--

P. - peso (mg), T. - tamaño (mm), F. - forma (A - anorfa, G - gota, EO - esfera ovalada, E - esfera), -- - No fue posible determinar.

De acuerdo a los anteriores resultados se decidió utilizar para el proceso de encapsulación de embriones somáticos a alginato de sodio de viscosidad media a una concentración de 1.25 % y como agente de complejación a CaCl₂ 100 mM.

El tamaño de las cápsulas puede variarse de acuerdo al diáme-

tro del instrumento de goteo, un tamaño menor de cápsulas puede obtenerse con un atomizador. Rehg et al. (1986), producen esferas de alginato de 1.2 y 2.3 mm de diámetro, con una desviación estandar del 10 %, si se desea un alto grado de uniformidad en el tamaño de las cápsulas o para diámetros menores de 1.0 mm, recomiendan no utilizar una concentración de alginato menor al 0.5 %.

Un punto importante que enfatizar, es el proceso de gelificación, por observaciones visuales, el uso de CaCl_2 a menos de 50 mM lleva a una gelificación inicial más lenta, en cambio a 200 mM la gelificación es inmediata. Rochefort et al. (1986), explican el fenómeno examinando la técnica de formación de cápsulas. Cuando una concentración relativamente alta de agente de complejación es colocada en contacto con la solución de alginato, la formación del gel es muy rápida, muchos sitios de intercambio catiónico superficiales son ocupados y se desarrollan resistencias difusionales, hay una alta superficie de entrecruzamiento, pero poca difusión. Con 50 y 100 mM de CaCl_2 , la gelificación inicial es más lenta, así el agente de complejación es capaz de penetrar más allá de la superficie y distribuir los sitios de entrecruzamiento más homogéneamente. Además en su estudio encuentran que gelificando a 100 mM de CaCl_2 seguido de un lavado en nitrato de aluminio se estabiliza más el gel de alginato, sin que se limite la viabilidad de levaduras encapsuladas.

El mecanismo de gelación de alginato, se piensa que es intramolecular e intermolecular (Morris et al., 1982), con enlaces covalentes y covalentes coordinados entre el calcio y los polímeros de ácido manurónico y ácido gulourónico.

Es importante notar que en los diferentes estudios en donde

se utiliza alginato, las concentraciones reportadas varían desde 0.5 hasta 5.0 %, esto se debe a que existen en el mercado internacional una gran cantidad de marcas de alginato, cada una con diferente peso molecular, viscosidad, pureza, etc. En un ensayo hecho con alginato de sodio marca BDH England Co., se requería un mínimo de alginato del 3.0 % para formar cápsulas no completamente esféricas, y como se mencionó, el alginato Sigma se utilizó en concentraciones máximas del 2.0 %, que incluso son ya difíciles de manejar.

La producción de esferas de gel de un tamaño adecuado para encapsular embriones somáticos con ácido poligalacturónico (pectinato), requiere concentraciones mayores del 5.0 %, si se desea cápsulas de menos de 4.0 mm de diámetro se puede utilizar una concentración más baja de pectinato. La formación de cápsulas con este gel requiere el uso de concentraciones de CaCl_2 mayores a 50 mM, en donde se forman cápsulas de alginato ya adecuadamente, a partir de 100 mM de la sal de calcio, es posible obtener cápsulas del tamaño requerido para la encapsulación de embriones somáticos.

En el cuadro 18, se presentan los resultados de producción de cápsulas de pectinato, no se aprecia ninguna tendencia con respecto a aumento de peso o tamaño de cápsulas en los diferentes tratamientos con cloruro de calcio o pectinato, como se observó en la producción de esferas de alginato.

Muy pocos reportes se encuentran en la literatura sobre inmovilización o encapsulación de material biológico en donde se utilice pectinato como soporte (Magaña, 1987).

En el presente estudio se observó que con práctica se obtie-

nen cápsulas en forma de esfera. Manualmente se apreció que la consistencia de cápsulas de pectinato es mayor que las de alginato. Del cuadro 18 y de diferentes ensayos de producción de cápsulas de pectinato, se optó por utilizar una concentración de 7.5% de ácido poligalacturónico y cloruro de calcio 200 mM, para los experimentos de encapsulación de embriones somáticos.

Cuadro 18.- Producción de cápsulas de pectinato de calcio a partir de ácido poligalacturónico y cloruro de calcio a diferentes concentraciones.

CaCl ₂ (mM)	Acido poligalacturónico								
	6.0 %			7.0 %			8.0 %		
	P.	T.	F.	P.	T.	F.	P.	T.	F.
50.0	98.3	--	A	72.2	--	A	95.1	--	A
100.0	101.7	--	A	96.5	5.0	G	108.6	5.4	EO
200.0	92.1	5.3	G	92.9	5.2	E	92.1	5.3	E
300.0	91.5	5.2	G	82.9	5.3	E	87.8	5.3	E
400.0	86.1	4.9	EO	86.4	5.1	E	76.8	5.0	E

P. - peso (mg), T. - tamaño (mm), F. - forma (A - amorfa, G - gota, EO - esfera ovalada, E - esfera), -- No fue posible determinar.

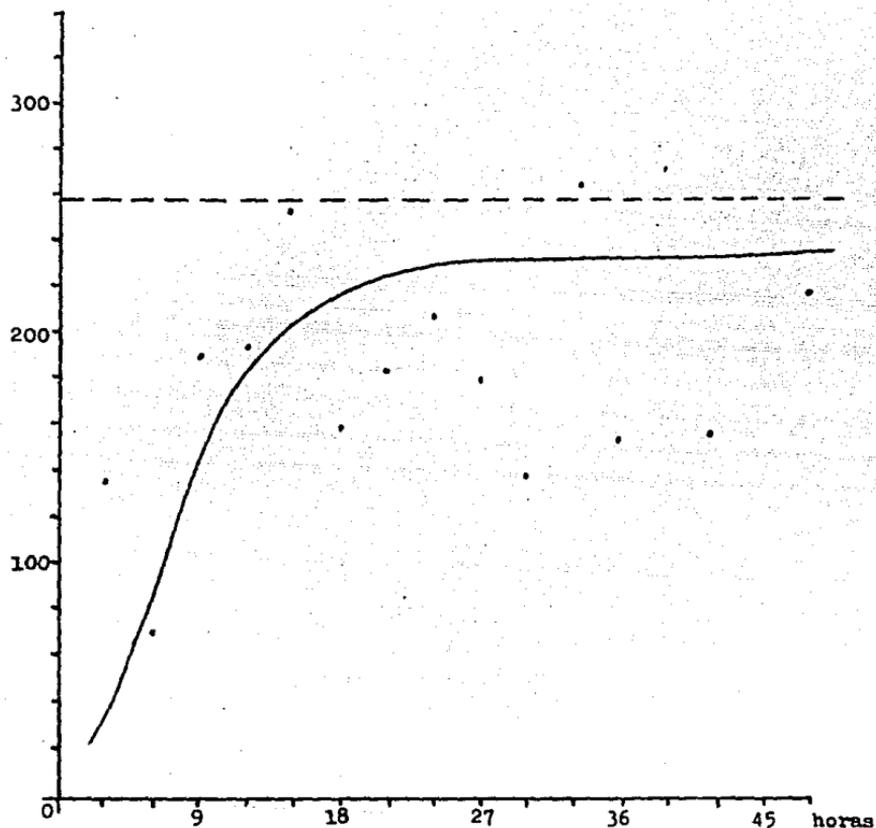
La transferencia de masa en el sistema embrión encapsulado-medio de cultivo es uno de los eventos críticos para la conversión de embriones somáticos encapsulados. Itamunoala (1987), informa

que los datos de coeficientes de difusión en geles de alginato son a menudo inconsistentes y variables entre diferentes reportes. En su estudio encontró que el coeficiente de difusión de glucosa en alginato se incrementa a bajas y altas concentraciones del monosacárido en el gel, lo atribuye en parte a las diferentes condiciones aplicadas, a la variación en los grados de error (problemas de precisión) y al proceso de difusión mismo.

En la presente investigación se estudió la difusión de nitrógeno del medio de cultivo a cápsulas de pectinato, en la gráfica 13 se muestra que existe difusión de nitrógeno del medio de cultivo a cápsulas de pectinato, se observa un constante recambio, que hasta cierto punto es normal porque; el contenido de humedad por cápsula es variable, también puede variar el contenido de nitrógeno en los medios preparados y como indica Itamunoala (1987), puede haber errores de precisión. En este experimento se observa (gráfica 13), que después de 9 horas de estar las cápsulas de pectinato en el medio de cultivo, ha difundido una alta concentración de nitrógeno a las cápsulas (comparada con la determinada en el medio de cultivo), después de 30 horas el nitrógeno difundido en algunas muestras es mayor que el encontrado en el medio de cultivo, lo cual puede ser lógico si el gel tiene afinidad por iones, en este caso de NH_4^+ y NO_3^- . Sin embargo, el mejor criterio para asegurar que embriones somáticos encapsulados reciben suficientes nutrimentos por difusión es el desarrollo y germinación de los embriones, los resultados positivos de encapsulación hicieron innecesario continuar con el análisis de difusión de otros nutrimentos (Carbono, Fósforo, Calcio, etc.) del medio de cultivo a las cápsulas de gel.

Por otro lado, el cuadro 19, muestra los resultados de redi

μg de nitrógeno/g de cápsulas



Gráfica 13.- Difusión de nitrógeno de medio de cultivo SH a cápsulas de pectinato al 7.5 %. La línea discontinua paralela a las abscisas indica la concentración de nitrógeno encontrada en el medio de cultivo.

solución de cápsulas de alginato en citrato de sodio, en los tratamientos con agitación el tiempo mínimo de redisolución fue de 75 minutos, por lo que no se probaron los tratamientos sin agitación, que seguramente hubieran tardado más tiempo en redisolverse - las cápsulas y se prefirió probar otro tipo de citrato, el de amonio.

Cuadro 19.- Tiempo de disolución en minutos, de cápsulas de alginato de calcio al 1.25 %[▲], con agitación (C/A) y sin agitación (S/A), en citrato de sodio.

Citrato de sodio + 2 % EDTA	pH					
	5.5		6.5		7.5	
	C/A	S/A	C/A	S/A	C/A	S/A
2.0 %	95	&	75	&	75	&
3.0 %	95	&	75	&	75	&
4.0 %	80	&	75	&	75	&

▲ - 15 cápsulas por tratamiento.

& - No determinado.

En el cuadro 20 se observan los tiempos de redisolución de cápsulas de alginato a cada una de las concentraciones de citrato de amonio. Con este experimento los tiempos de redisolución se redujeron considerablemente, en ambos experimentos parece no haber relación en el tiempo de redisolución con respecto al pH, en las concentraciones de citrato empleadas. En subsecuentes experi

mentos y cada vez que se necesitó redisolverse cápsulas de alginato, se utilizó una solución de citrato de amonio al 2.0 % a pH 6.5 en presencia de EDTA al 2.0 %, con ligera agitación. La presencia del EDTA fue con el fin de quelar los iones de calcio liberados y facilitar la redisolución.

Cuadro 20.- Tiempo de disolución en minutos, de cápsulas de alginato de calcio al 1.25 %^A, con agitación (C/A) y sin agitación (S/A), en citrato de amonio.

Citrato de amonio + 2 % EDTA	pH					
	5.5		6.5		7.5	
	C/A	S/A	C/A	S/A	C/A	S/A
2.0 %	22	80	21	30	19	65
3.0 %	36	70	30	65	26	60
4.0 %	35	95	27	50	30	35

A - 15 cápsulas por tratamiento.

La redisolución de cápsulas de pectinato tampoco presentó problemas, comúnmente se utilizó una solución amortiguadora de fosfatos 200 mM pH 6.0, en presencia de EDTA al 1.5 % con ligera agitación, de acuerdo al procedimiento proporcionado por García y Arellano (1988).

La redisolución de cápsulas sólo presenta dificultades cuando se requieren condiciones muy específicas, como rescatar material biológico (células, organelos o microorganismos), en el presente estudio el único requisito fue lograr una rápida y eficiente redi-

solución de esferas de alginato y pectinato, por lo que los protocolos de redisolución descritos para cada tipo de gel son adecuados.

F. ENCAPSULACION DE EMBRIONES SOMATICOS.

Una vez que se hubo completado el estudio para estandarizar las condiciones de producción de cápsulas de alginato y pectinato, se procedió a incluir dentro de las cápsulas a embriones somáticos de alfalfa y apio. El tamaño del capilar usado (3.5 mm), para la producción de esferas de gel, fue el adecuado; los embriones aún cuando tuvieran un tamaño mayor a 3.5 mm en longitud, su grosor difícilmente es mayor a 3.0 mm, además para encapsular embriones utilizando capilares de mayor diámetro, se necesitan altas concentraciones de alginato o pectinato y las cápsulas pierden su forma esférica, en cambio empleando capilares menores a 3.0 mm algunos embriones (los mayores), presentan problemas de manejo con la técnica de encapsulación descrita.

La concentración de agente de complejación (CaCl_2 100 mM y 200 mM para alginato y pectinato, respectivamente), utilizada para la producción de cápsulas de gel, no afecta el desarrollo de embriones somáticos de apio encapsulados. En sus estudios de encapsulación Matteau y Saddler (1982), utilizan CaCl_2 300 mM para inmovilizar al hongo Trichoderma sp. en alginato al 2.0 %, por su parte Tipayang y Kosak (1982), emplean concentraciones de CaCl_2 y alginato de 270 mM y 3.0 %, respectivamente.

En los estudios de encapsulación de material biológico se u-

utilizan concentraciones de alginato que van desde 0.6 % (Franklin y Moss, 1981), hasta 3.0-4.0 % (Tipayang y Kosak, 1982), - las diferencias se deben a la gran diversidad de tipos de algina- tos presentes en el mercado.

En el presente estudio, se tomó como base para la selección del tipo de alginato a usar en la encapsulación de embriones somá- ticos a aquel que presentara mayor facilidad de manejo y que pro- duxera esferas de mayor consistencia, con forma y tamaño adecua- das para contener embriones somáticos de apio o alfalfa. De los tres tipos de alginato probados, se seleccionó al alginato de so- dio de viscosidad media (3500 cps), por reunir los requisitos mencionados.

Aún cuando no fue posible evaluar cuantitativamente la con- sistencia de cápsulas de gel con embriones somáticos, las caracte- rísticas de las esferas y sus condiciones de producción (tama- ño, forma, tipo de gel, agente de complejación, etc.), fueron - muy similares a las reportadas por Redenbaugh et al. (1986a), por lo que se puede inferir que las cápsulas utilizadas para el atra- pamiento de embriones somáticos, tienen una consistencia igual o mayor a 0.5 kg/cápsula. De acuerdo con Redenbaugh y col. una con- sistencia de 0.5 a 2.0 kg/cápsula proporciona suficiente integri- dad a las cápsulas para manejarlas individualmente en equipos de siembra de semillas peletizadas.

El tiempo mínimo de complejación de gel es de 10 a 15 minu- tos, dependiendo de la concentración de gel y CaCl_2 utilizada, - con tiempos menores no hay gelificación completa y se producen es- feras huecas.

Los problemas de contaminación de embriones somáticos encap-

sulados fueron nulos, siempre que se trabajó con material bien esterilizado; a este respecto se observó que un excesivo tiempo de esterilización de los geles, principalmente pectinato, produce disminución en la viscosidad del gel y consecuentemente en la calidad de las cápsulas formadas, se recomienda un tiempo máximo de esterilización de 25 minutos a 15-17 lb/in² y 120-121 °C.

En los primeros ensayos de encapsulación se trabajó con embriones somáticos de alfalfa A 70.34, sin embargo el efecto de la encapsulación sobre la frecuencia de conversión fue difícil de asegurar, aún cuando se observó que los embriones somáticos de alfalfa son capaces de romper la cápsula y germinar como si no estuviesen encapsulados.

Es posible encapsular embriones somáticos de cualquier especie, pero se consideró que sólo deben encapsularse embriones somáticos de alta calidad y con altos porcentajes de germinación, para que la tecnología de producción de semillas artificiales tenga una base más sólida. Por eso aún cuando en los primeros experimentos de germinación en alfalfa A 70.34, se alcanzaron frecuencias de conversión de alrededor del 40 %, se consideró; para que los resultados de encapsulación no se vieran enmascarados, se necesitaba aumentar la calidad de los embriones somáticos de alfalfa.

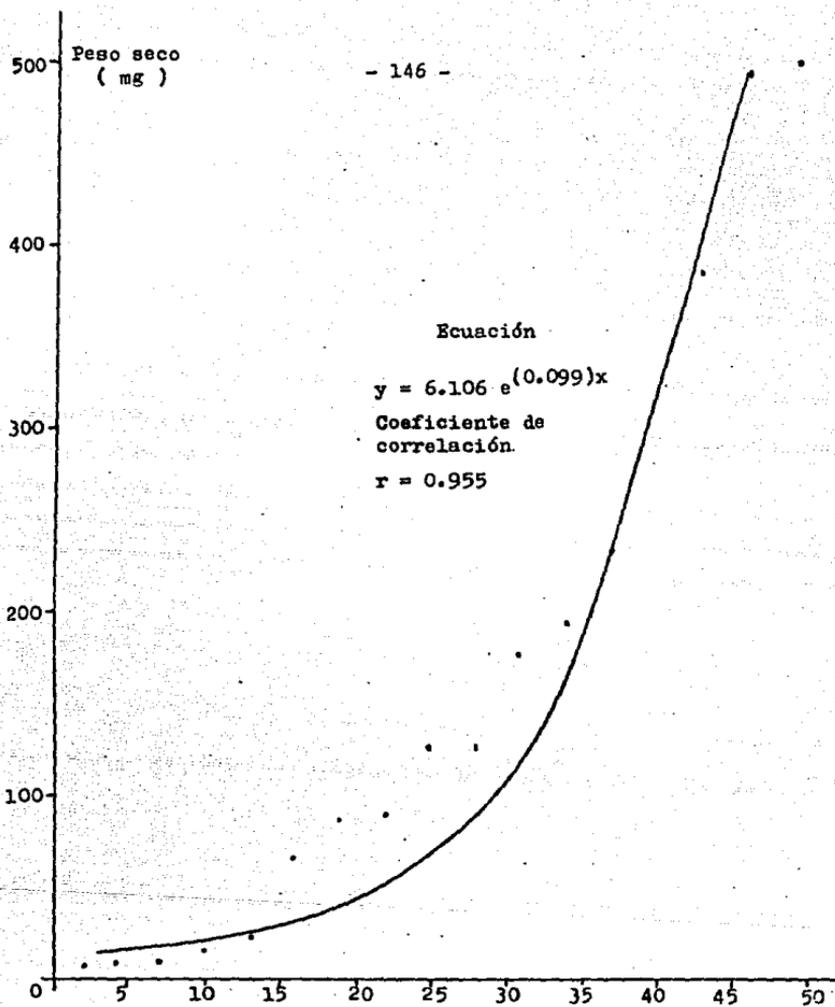
De aquí que se optara por dos rutas de trabajo: 1) Para desarrollar una metodología de encapsulación de embriones somáticos, utilizar un sistema de embriogénesis somática que produjera embriones con altos porcentajes de conversión, la especie seleccionada fue apio, por ser una de las líneas de investigación en el laboratorio y por poseer el sistema de embriogénesis in vitro --

bien establecido (Vega, 1987) y 2) manipular las condiciones de cultivo del sistema de embriogénesis somática en alfalfa A 70. 34, con el fin de obtener embriones adventicios de alta calidad y con altos porcentajes de conversión.

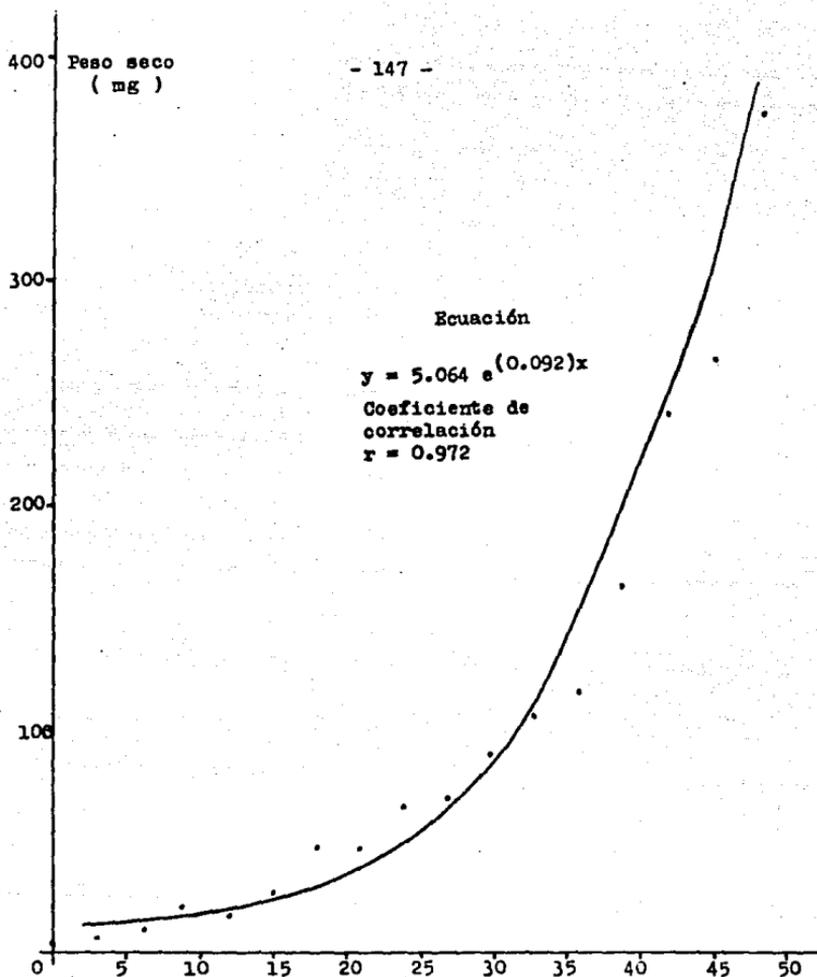
Con el fin de evaluar el desarrollo de embriones somáticos de apio encapsulados y no encapsulados, se siguieron sus respectivas cinéticas de crecimiento. Las gráficas 14 y 15, muestran el desarrollo de embriones somáticos (hasta el día 48), encapsulados en alginato al 1.25 % y pectinato al 7.5 %, los resultados -- del control (desarrollo de embriones no encapsulados), se presenta en la gráfica 16. En las tres gráficas se aprecia el inicio del típico desarrollo observado en los sistemas biológicos en crecimiento (fases de reposo y exponencial), las fases restantes (lineal, disminución progresiva y estacionaria) (Luna, -- 1987), no se evaluaron porque en este tiempo el desarrollo de las plántulas ya es independiente de la cubierta de encapsulación.

Asimismo, se observa que el desarrollo de embriones somáticos de apio encapsulados en alginato y en pectinato, es inicialmente más lento que el de sus correspondientes no encapsulados y tardan más tiempo en entrar a la fase exponencial, de este experimento se concluye que la cubierta de encapsulación no limita el desarrollo de embriones somáticos de apio encapsulados.

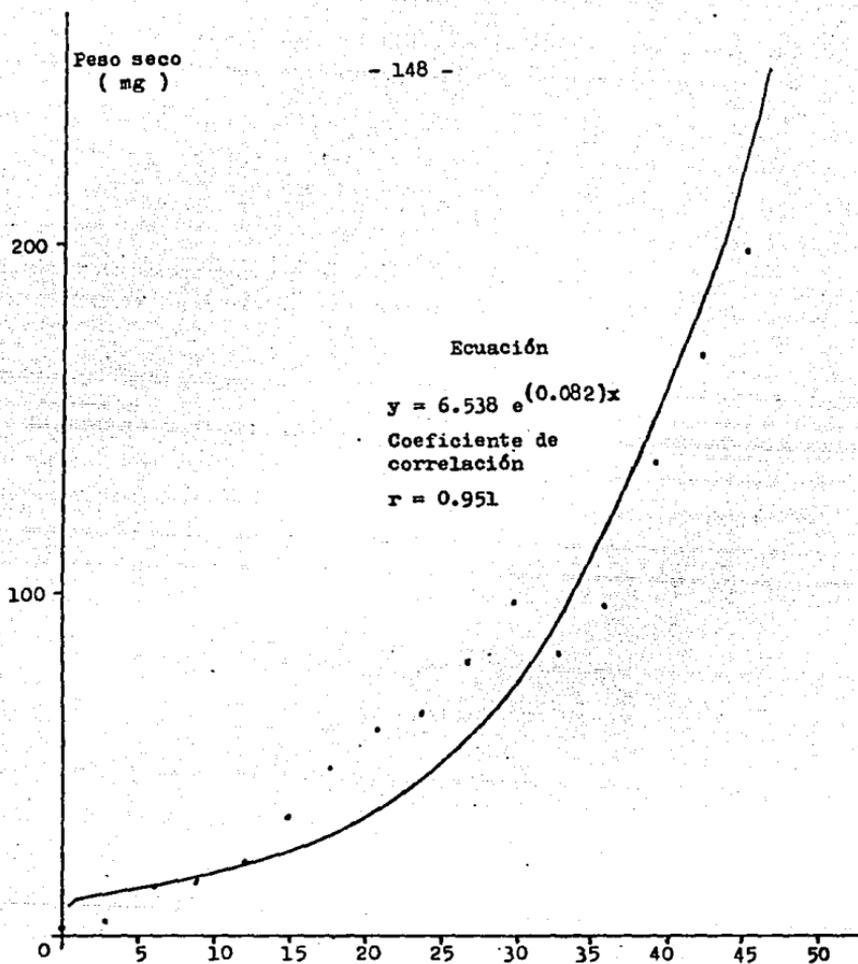
Con respecto a la viabilidad de embriones somáticos de apio, no se aprecia diferencia entre embriones encapsulados en alginato y embriones no encapsulados (cuadro 21), en cambio la viabilidad de embriones encapsulados en pectinato, disminuye en los primeros días de cultivo, esta disminución puede ser atribuida a -- que el gel de pectinato es más sensible a cambios de pH, en el valor empleado (6.0 ± 0.1), no obstante al final del desarrollo --



Gráfica 14.- Cinética de crecimiento (peso seco) de embriones somáticos de apio encapsulados en alginato de calcio al 1.25 % y sembrados en medio de germinación.



Gráfica 15.- Cinética de crecimiento (peso seco) de embriones somáticos de apio encapsulados en ácido poligalacturónico al 7.5 % y sembrados en medio de germinación.



Gráfica 16.- Cinética de crecimiento (peso seco) de embriones somáticos de apio no encapsulados (testigo), sembrados en medio de germinación.

Cuadro 21.- Porcentajes de viabilidad^a de embriones somáticos de apio encapsulados en alginato al 1.25 % y pectinato al 7.5 % y de embriones no encapsulados.

Días en medio de germinación	Alginato al 1.25 %	Pectinato al 7.5 %	Sin encapsular
0	100.0	94.1	94.1
3	88.2	71.4	83.3
6	90.9	56.2	87.5
9	80.0	73.3	93.3
12	77.7	72.2	100.0
15	94.4	64.2	100.0
18	90.9	68.7	92.8
21	84.6	70.5	84.6
24	94.1	92.8	85.7
27	90.0	88.2	86.6
30	94.4	87.5	81.2
33	83.3	93.7	85.7
36	92.3	100.0	84.6
39	81.8	100.0	92.3
42	93.3	100.0	100.0
45	100.0	100.0	100.0
48	100.0	100.0	100.0

a - 15 embriones por muestra.

la viabilidad es similar en los tres tratamientos. Una alternativa para aumentar el porcentaje de viabilidad de embriones somáticos de apio encapsulados en pectinato, es incluir en este gel a un buffer biológico para evitar variaciones en el pH del gel de pectinato.

En el primer experimento de encapsulación donde se evaluó el porcentaje de conversión (cuadro 22), se observa que tanto en alginato como en pectinato hay una sensible disminución en el porcentaje de conversión de embriones somáticos con respecto a sus controles sin encapsular. El porcentaje de conversión de embriones somáticos de apio no encapsulados fue rutinariamente de alrededor del 90 %, lo que indica que la disminución en el porcentaje de conversión de embriones encapsulados a plántulas se debía al proceso de encapsulación o bien a algún factor inherente, como: disponibilidad de nutrimentos, difusión de gases, el atrapamiento mismo del embrión o incluso el estado fisiológico del mismo.

Cuadro 22.- Porcentajes de conversión de embriones somáticos de apio encapsulados en alginato y pectinato.

Tratamiento de encapsulación	Embriones encapsulados	% de conversión	% de embriones muertos
Alginato al 1.25 %	146	56.1	43.8
Control, embriones sin encapsular	98	90.8	9.1
Pectinato al 7.5 %	112	53.5	46.4
Control, embriones sin encapsular	95	87.3	12.6

Redenbaugh et al. (1986a), reportan el porcentaje de conversión de embriones somáticos encapsulados en alginato (alfalfa - 29 %, apio 55 %) y mencionan que no encontraron diferencias significativas con los embriones no encapsulados (alfalfa 32 %, apio 61 %). En sus estudios de encapsulación Redenbaugh y col. inicialmente utilizan alginato BDH al 3.2 % y CaCl_2 50 mM, para obtener esferas de gel, recientemente (Redenbaugh et al., 1987), emplean alginato Sigma al 2.0 % y CaCl_2 100 mM, el porcentaje de conversión que obtienen entonces es de casi el 50 % en alfalfa. En un reciente estudio de encapsulación de embriones somáticos de pino, Gupta y Durzan (1987), utilizan alginato al 1.0 % y CaCl_2 - 100 mM, sin embargo la frecuencia de conversión que obtienen es de 0.0 %.

Los estudios de la presente investigación muestran que la conversión de embriones somáticos encapsulados está directamente relacionada con la calidad del embrión. Los embriones de mejor apariencia y morfología normal no tuvieron problemas para romper la cápsula de gel y continuar su desarrollo hasta plántula, en cambio embriones anormales, pequeños o con bajo vigor tienen mayores problemas para romper su cubierta y algunos de ellos mueren en la cápsula.

Hasta la fecha Redenbaugh et al. (1987), han reportado la encapsulación de embriones somáticos principalmente en alginatos.

Una familia de polisacáridos similares a los alginatos y que pueden ser utilizados como matriz de encapsulación son las pectinas.

En el presente estudio se desarrolló una matriz de encapsulación utilizando ácido poligalacturónico al 7.5 % y CaCl_2 200 mM.

En sus estudios de inmovilización de células Montes y Magaña (1987), emplean pectinato al 5.0 %, en nuestro caso la mayor concentración de pectinato usada se debe a la necesidad de obtener cápsulas de diámetro mayor a 4.0 mm.

En un segundo experimento de encapsulación y para mejorar el porcentaje de conversión de embriones somáticos, se probó incluir en las cápsulas de alginato y pectinato al medio de cultivo. En el cuadro 23, se aprecia que la inclusión de medio de cultivo en el gel de alginato mejora el porcentaje de conversión de embriones somáticos de apio, siendo éste mayor al 60 %, en cambio la inclusión del medio de cultivo en el gel de pectinato no mejora el porcentaje de conversión, una vez más se hace referencia a los posibles cambios de pH en el gel de pectinato, una solución que se propone a este problema es encapsular en presencia de un buffer biológico.

Por otra parte y en relación a este experimento Fujii et al. (1987), indican que uno de los principales factores que limitan el desarrollo de semillas artificiales es probablemente la disponibilidad de nutrimentos (sales y carbohidratos); para superar este problema los embriones deben tener sus propios nutrimentos (alto contenido de proteínas y carbohidratos de reserva) o proporcionárselos exógenamente (proponen el desarrollo de un endospermo "artificial").

Un objetivo a más largo plazo en la presente investigación es desarrollar una segunda cubierta de protección, hidrofóbica y semipermeable, con el fin de poder manejar a los embriones individualmente y sin necesidad de tener rigurosas condiciones de asepsia. Los reportes publicados por el grupo de Plant Genetics Inc. mencionan esta segunda cubierta, pero en ningún momento proporcionan su composición.

Un compuesto que puede funcionar como segunda cubierta es la polilisina (Mullon, 1987), con una membrana de polilisina es posible, si se desea, redissolver el interior de la cápsula y ésta no tendrá problemas de deshidratación, como los que se presentan utilizando únicamente el gel de alginato o pectinato. La causa por la que no se utilizó este polímero fue su alto costo.

Cuadro 23.- Porcentajes de conversión de embriones somáticos de a pio encapsulados en alginato y pectinato, en donde se incluyó al medio de cultivo.

Tratamiento de encapsulación	Embriones encapsulados	% de conversión	% de embriones muertos
Alginato al 1.25 % en medio de germinación	191	62.8	37.1
Control, alginato al 1.25 % sin medio de cultivo	108	42.5	57.4
Pectinato al 7.5 % en medio de germinación	92	51.0	48.9
Control, pectinato al 7.5 % sin medio de cultivo	112	53.5	46.4

Kitto y Janick (1985), reportan aumento en el porcentaje de conversión de embriones somáticos de zanahoria encapsulados en óxido de polietileno, por aplicación de pretratamientos con frío

y obscuridad, siguiendo el mismo fin, se encapsularon embriones somáticos de apio, dando a los embriones un pretratamiento en frío $3 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y en obscuridad. En el cuadro 24, se observa que los embriones con pretratamiento y sin encapsular siguen manteniendo su porcentaje de conversión (89.1 %) comparable a embriones sin pretratamiento y sin encapsular. Los embriones encapsulados y con pretratamiento mejoran su porcentaje de conversión; en alginato se alcanza un porcentaje de conversión cercano al 80 % y en pectinato supera el 60 %. Por otro lado el segundo control (embriones somáticos encapsulados sin pretratamiento), mantienen bajos porcentajes de conversión (59.7 % en alginato y 55.2 % en pectinato), similares a los obtenidos en experimentos previos.

De los resultados de encapsulación de embriones somáticos se puede concluir que la cubierta de protección proporcionada a los embriones no limita su desarrollo si se utilizan embriones somáticos de alta calidad y se determinan las condiciones de germinación apropiadas en los embriones somáticos.

En el caso del sistema de embriogénesis somática de alfalfa A 70.34, la encapsulación de embriones sólo se llevo a nivel de ensayos, se observó que al igual que en apio los embriones somáticos no limitan su desarrollo y germinación por presencia de la cubierta de encapsulación.

Una alternativa para encapsular embriones somáticos de alfalfa A 70.34 es utilizar embriones seleccionados, aún cuando no se llevo a cabo, utilizando embriones con las mejores características se tendría porcentajes de conversión más altos.

Otra opción sería encapsular embriones somáticos de otra especie, incluso serviría como control para extrapolar resultados.

Cuadro 24.- Porcentajes de conversión de embriones somáticos de apio encapsulados en alginato y pectinato, con previo pretratamiento en frío y oscuridad.

Gel	Tratamiento de encapsulación	Embriones encapsulados	% de conversión	% de embriones muertos
ALGINATO 1.25%	Control 1. embriones pretratados en frío 3 °C y obsc. por 48 horas, sin encapsular.	83	89.1	10.8
	Control 2, embriones encapsulados sin pretratamiento.	97	59.7	40.2
	Embriones con pretratamiento encapsulados.	157	78.9	21.0
PECTINATO 7.5%	Control 1, embriones pretratados en frío 3 °C y obsc. por 48 horas, sin encapsular.	70	87.1	12.6
	Control 2, embriones encapsulados sin pretratamiento.	96	55.2	44.7
	Embriones con pretratamiento encapsulados.	110	66.3	33.6

G. OBTENCION DE PLANTAS EN CONDICIONES DE INVERNADERO.

Morfológicamente no se aprecia ninguna diferencia entre las plántulas provenientes de embriones somáticos de apio encapsulados y no encapsulados y tampoco hubo diferencias significativas (cuadro 25) en el porcentaje de aclimatación de plántulas a invernadero, sin embargo se observó que este paso es difícil, las plántulas trasplantadas poseían un buen sistema radicular y buen desarrollo de brotes, no obstante la frecuencia de aclimatación fue baja, probablemente porque no se cuenta con un invernadero bien implementado.

Con la aclimatación de plántulas de apio, provenientes de embriones somáticos desarrollados in vitro, se completó un esquema de propagación clonal en apio vía embriogénesis somática, en el cual queda incluida la metodología de encapsulación de embriones somáticos.

Cuadro 25.- Porcentajes de plántulas de apio aclimatadas en invernadero, provenientes de embriones somáticos encapsulados y no encapsulados.

Plántulas provenientes de embriones encapsulados		Plántulas provenientes de embriones no encapsulados	
Trasplantadas	Aclimatadas (%)	Trasplantadas	Aclimatadas (%)
46	28.2	42	26.1

CONCLUSIONES.

Para proponer un sistema de propagación clonal masiva de -- plantas obtenidas in vitro, ya sea por vía directa (propagación por brotes ápices o meristemas) o por vía indirecta (organogénesis o embriogénesis somática), es necesario, no el análisis de algún factor aislado, sino la integración de una gran cantidad de variables que van desde la desdiferenciación y rediferenciación de células de genotipos seleccionados, hasta la evaluación de costos de producción. En el presente estudio donde el objetivo principal fue, desarrollar una metodología de encapsulación de embriones somáticos para la propagación masiva de plantas de interés comercial o agrícola, se llegó a las siguientes conclusiones:

El alginato de sodio y el ácido poligalacturónico (pectinato), son dos polisacáridos que por reacción de intercambio iónico producen esferas de gel insolubles en agua que funcionan adecuadamente como matriz de encapsulación para contener embriones somáticos obtenidos in vitro. En la encapsulación de embriones somáticos de apio y alfalfa se utilizó alginato de sodio de viscosidad media (3500 cps) al 1.25 % y pectinato al 7.5 %, como intercambiador catiónico se emplearon soluciones de CaCl_2 100-200 mM, con lo que se produjeron esferas de gel de 4-6 mm de diámetro, mismas que no limitan la germinación y desarrollo hasta plántulas de embriones somáticos de apio y alfalfa encapsulados.

La difusión de nutrimentos del medio de cultivo hacia las cápsulas es un factor crítico para la germinación de embriones somáticos encapsulados, se encontró en cápsulas de pectinato, "sembradas" en medio de cultivo, que después de 9-12 horas, la cantidad de nitrógeno difundido del medio a las cápsulas, es similar --

o superior a la determinada en el mismo medio, con lo que se comprobó que los embriones encapsulados no tienen carencia de nitrógeno y probablemente tampoco de otros nutrimentos, durante su germinación en medio de cultivo.

La redisolución de cápsulas se lleva a cabo en 15-30 minutos en soluciones de citrato de amonio al 2.0 % pH 6.5 (esferas de alginato) y buffer de fosfatos 200 mM pH 7.0 (esferas de pectinato), ambos procesos en presencia de EDTA al 1.5-2.0 %.

El cloruro de trifeniltetrazoleo (TTC), es un buen indicador de la viabilidad de embriones somáticos encapsulados y no encapsulados, embriones viables, después de 6-8 horas de estar en solución de TTC al 0.1 % adquieren una coloración roja, no así los no viables.

El patrón de crecimiento, durante la germinación y desarrollo de embriones somáticos de apio encapsulados en alginato y pectinato y de embriones no encapsulados es idéntico, lo que indica que la cubierta de encapsulación no tiene efectos dañinos sobre el desarrollo del embrión para llegar a plántula.

Para obtener un mayor porcentaje de conversión de embriones somáticos de apio encapsulados, se necesita incluir en la matriz de encapsulación al medio de cultivo y preacondicionar a los embriones en frío (3 ± 2 °C) y obscuridad por 48 horas, con el fin de que los embriones rompan más fácilmente la cápsula y lleguen a plántulas. La germinación de embriones somáticos de apio no encapsulados fue comúnmente del 85-90 %, en los experimentos de encapsulación de embriones, se alcanzó un porcentaje de germinación de 78.9 %.

El protocolo básico de encapsulación de embriones somáticos

desarrollado en la presente investigación puede ser aplicado a otras especies donde el proceso de embriogénesis in vitro sea posible. Los resultados preliminares de encapsulación de embriones somáticos de alfalfa, indican que la cubierta de protección tampoco limita la germinación y desarrollo de sus embriones. No obstante faltan desarrollar algunos aspectos de la tecnología de producción de "semillas artificiales"; en primer lugar, proporcionar una segunda cubierta de encapsulación con el fin de manejar a las semillas "somáticas" en condiciones no asépticas; simultáneamente hacer estudios para el escalamiento en la producción de embriones somáticos en biorreactor; tratar de inducir latencia en los embriones somáticos; posteriormente evaluar costos de producción para ver si el proceso es costeable y finalmente comparar la respuesta agronómica en campo o invernadero de plantas provenientes de embriones somáticos encapsulados, con plantas de origen sexual.

Con respecto a la manipulación en las condiciones de cultivo de los sistemas de embriogénesis estudiados, se llegó a las siguientes conclusiones:

Se propone un nuevo protocolo de embriogénesis somática para alfalfa A 70.34, en donde se utiliza pecíolos como fuente de inóculo. En la inducción de embriogénesis se sugiere el medio B₅ suplementado con 1.0 mg/l de 2,4-D, 0.2 mg/l de Kn, 1.75 g/l de casaminoácidos, 30 g/l de sacarosa y 9 g/l de bacto agar, durante 12-15 días. Para la diferenciación de embriones somáticos, transferir los inóculos a medio B₅ sin reguladores del crecimiento, adicionando 1.75 g/l de casaminoácidos, 30 g/l de sacarosa y 9 g/l de bacto agar, durante 24-27 días. Para la conversión, rescatar los embriones en medio MS basal al 50 %, suplementado con 15 g/l de sacarosa, 0.01 mg/l de GA₃ y 8 g/l de bacto agar.

La respuesta embriogénica en alfalfa depende del genotipo, las variedades o líneas que tienen alta contribución genética de Medicago falcata poseen naturalmente alta respuesta embriogénica, así en alfalfa Fl.1, se encontraron respuestas en embriogénesis mayores al 90 %. En alfalfa A 70.34, cuya mayor aportación genética proviene de M. sativa, la respuesta en embriogénesis es relativamente baja cuando se parte de semillas, inicialmente se obtuvieron respuestas del 10 al 15 %; por selección recurrente (identificación y clonación de plantas embriogénicas), se alcanzaron respuestas mayores al 90 %.

Sin selección recurrente el rendimiento de embriones somáticos es significativamente mayor en alfalfa Fl.1 que en A 70.34, - en esta última línea se alcanzaron rendimientos similares a alfalfa Fl.1 (en promedio 20 embriones por inóculo), por manipulación de las condiciones de cultivo.

Con la separación de las fases de inducción y desarrollo de los sistemas de embriogénesis en alfalfa A 70.34 y apio, se evita la acción de los reguladores del crecimiento (principalmente el 2,4-D) durante la diferenciación de los embriones somáticos, lo que redundaría en una mejor morfología y mayor calidad de los embriones obtenidos.

Los aminoácidos proporcionados al medio de desarrollo como caseína hidrolizada, aumentan el rendimiento de embriones somáticos de alfalfa A 70.34, su acción se refleja principalmente durante la diferenciación de los embriones más que en la inducción de la embriogénesis, en esta última el suministro de aminoácidos se puede prescindir. Sería interesante investigar el efecto de aminoácidos específicos para ver cual o cuales son los más importantes en el proceso de diferenciación de embriones somáticos de al

falfa A 70.34.

El ácido abscísico (ABA), en un intervalo de concentraciones de 0.1-1.0 mg/l, aplicado durante el desarrollo de embriones somáticos de alfalfa A 70.34, hace producir al momento del trasplante a medio de germinación, poblaciones de embriones predominantemente en estado torpedo. Además, su acción continúa durante la germinación, retrasándola, aún cuando se hayan trasplantado a los embriones a un medio sin ABA. Una buena perspectiva sería probar - pulsos cortos con ABA al final del desarrollo de los embriones, - junto con otros tratamientos de "stress" (obscuridad, deshidratación, etc.), con el fin de lograr la acumulación de proteínas de reserva, mayor sincronización e incluso la inducción de latencia en los embriones somáticos.

El desarrollo de embriones somáticos de alfalfa A 70.34, bajo diferentes tipos de "stress" (disminución en la fuente de carbono, deshidratación, acción del ácido abscísico, desarrollo en - completa obscuridad, etc.), produce en general una disminución en el rendimiento de embriones somáticos, en cambio se observó un incremento en la síntesis de proteínas de reserva 7 S y 11 S, - principalmente bajo la acción del ABA o cuando el desarrollo de los embriones fue en completa obscuridad. La mayor tasa de síntesis de proteínas de reserva indica aumento en la calidad de los - embriones somáticos.

El análisis de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS, revela que el patrón de proteínas determinado en embriones somáticos de alfalfa A 70.34 es idéntico, por lo menos en las proteínas de reserva 7 S y 11 S, al patrón de proteínas de semillas de alfalfa A 70.34.

La acción del 2,4-D durante todo el desarrollo de los embriones somáticos de alfalfa, produce una tasa menor de síntesis de proteínas de reserva 7 S y 11 S. Cuantitativamente (método Bradford) y cualitativamente (geles de poliacrilamida), se comprobó que la mayor cantidad de proteínas de reserva, encontradas en embriones somáticos de alfalfa A 70.34, ocurre cuando la inducción en presencia de reguladores es de 12-15 días y el desarrollo es sin reguladores y en presencia de 1.75 g/l de casamino ácidos.

Las proteínas de reserva 7 S y 11 S, son un buen marcador bioquímico para utilizarlas como criterio de calidad de embriones somáticos de alfalfa.

Con los protocolos de extracción de proteínas de embriones somáticos de alfalfa, se observó en los geles de poliacrilamida, que en la fracción de albúminas aparecían bandas características de proteínas de reserva 7 S y 11 S (en semilla únicamente presentes en la fracción de globulinas), lo que indica que posiblemente los monómeros de las proteínas de reserva no se ensamblan para alcanzar su estructura terciaria y cuaternaria, en lo que puede ser la causa de la pobre acumulación de proteínas de reserva en embriones somáticos de alfalfa.

Finalmente, se encontró que no existe diferencia significativa en los resultados de aclimatación de plántulas de apio, provenientes de embriones somáticos encapsulados y no encapsulados en condiciones de invernadero.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Al-Abta, S. y Collin, H.A. 1978. Control of embryoid development in tissue culture of celery. *Annals of Botany*. 42, 773-782.
- 2.- Al-Abta, S. y Collin, H.A. 1979. Endogenous auxin and cytokinin changes during embryoid development in celery tissue cultures. *New Phytol.* 82, 29-36.
- 3.- Ammirato, P.V. 1983. Embryogenesis. In: *Handbook of plant cell culture*. V. 1. Evans, D.A., Sharp, W.R., Ammirato, P.V. y Yamada Y. (Eds.). New York. MacMillan Publishing Co. p. 82-123.
- 4.- Ammirato, P.V. 1987. Organizational events during somatic embryo genesis. In: *Plant tissue and cell culture*. V. 3. Green, C.E., Somers, D.A., Hackett, W.P. y Biesboer, D.D. (Eds.). Alan R. Liss Inc. New York. p. 57-81.
- 5.- Arjona, A. y Magaña, I.P. 1987. Hidrólisis de almidón de la harina de barbasco, fermentada con células inmovilizadas en un reactor de lecho fluidizado. *Memorias II Congreso nacional de Biotecnología y Bioingeniería*. Cd. de Durango. México. p. 91.
- 6.- Atanassov, A. y Brown, D.C.W. 1984. Plant regeneration from suspension culture and mesophyll protoplasts of Medicago sativa L. *Plant cell, tissue and organ culture*. 3, 149-162.
- 7.- Barnes, E.W.D., Bingham, R.T., Murphy, R.P., Hunt, O.J., Beard, D.F., Skirdia, W.H. y Teuber, L.R. 1977. Alfalfa germoplasm in the United States: Genetic vulnerability, use, improvement and maintenance. *USDA/ARS Technical Bulletin* 1571.
- 8.- Blaydes, D.F. 1966. Interaction of kinetin and various inhibitors in the growth of soybean tissue. *Physiol. Plant.* 19, 748-753.
- 9.- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals Biochem.* 72, 248-254.
- 10.- Bradley, P.M., El-Foki, D. y Gilies, K.L. 1984. Polyamines and

- arginine affect somatic embryogenesis of Daucus carota. Plant Science Letters. 34, 398-401.
- 11.- Browsers, M.A. 1981. Chromosomal variability in tissue and cell culture of celery (Apium graveolens L.). M.S. Dissertation, University of California, Davis.
- 12.- Browsers, M.A. y Orton, T.J. 1982. A factorial study of chromosomal variability in callus cultures of celery (Apium graveolens L.). Plant Science Letters. 26, 65-73.
- 13.- Brown, D.C.W. y Atanassov, A. 1985. Role of genetic background in somatic embryogenesis in Medicago. Plant cell, tissue and organ culture. 4 (2): 111-122.
- 14.- Burton, J.C. 1972. Nodulation and symbiotic nitrogen fixation. In: Alfalfa Science and Technology. Hanson, H.C. (Ed.). American Society of Agronomy, Inc. p. 229-235.
- 15.- Cheetham, S.J.P., Imber, E.C. and Isherwood, J. 1982. The formation of isomaltulose by immobilized Erwinia rhapsontici. Nature. 299, 628-631.
- 16.- Chen, C.H. 1976. Vegetative propagation of the celery plant by tissue culture. Proc. S. Dakota Acad. Sci. 55, 44-48.
- 17.- Chen, L.S. y Luthé, D.S. 1987. Analysis of proteins from embryogenic and non-embryogenic rice (Oryza sativa L.) calli. Plant Science. 489, 181-188.
- 18.- Chrimes, J.R. y Gray, D. 1982. Comparisons of the use of pregerminated, dry and pellet seeds for block-raising of glasshouse lettuce. Scientia Horticulturæ. 17 (1): 15-25.
- 19.- Christianson, M.L. 1985. An embryogenic culture of soybean: towards a general theory of somatic embryogenesis. In: Tissue culture in forestry and agriculture. Renke, R.R., Hugues, K.W., Constantin, M. y Hollaender, A. Plenum Press. New York. p. 83-103.
- 20.- Christianson, M.L. 1987. Causal events in morphogenesis. In: Plant tissue and cell culture. V. 3. Green, C.E., Somers, D.A.,

- Hackett, W.P. y Biesboer, D.D. (Eds.). Alan R. Liss Inc. New York p. 45-55.
- 21.- Crouch, M.L. 1981. Development and storage-protein synthesis in Brassica napus L. embryos in vivo and in vitro. Planta. 153, - 64-74.
 - 22.- Crouch, M.L. 1982. Non-zigotic embryos of Brassica napus L. contain embryo-specific storage proteins. Planta. 156 (6): 520-524.
 - 23.- Croughan, T.P., Stavarek, S.J. y Rains, D.W. 1978. Selection of a NaCl tolerant line of cultured alfalfa cells. Crop Science. 18, 959-963.
 - 24.- Darvill, A.G., Collin, D.J., Chelf, P. y Albersheim, P. 1985. Manipulation of the morphogenetic pathways of tobacco explants by oligosaccharins. Nature. 314, 615-617.
 - 25.- De León, M. 1985. Manual de prácticas de bioquímica. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. I.P.N. p. 22.
 - 26.- Derbyshire, E. et al. 1976. Legumin and vicilin storage proteins in legume seeds. Phytochemistry. 15, 3-24.
 - 27.- Dijak, M., Smith, D.L., Wilson, T.J. y Brown, D.C.W. 1986. Stimulation of direct embryogenesis from mesophyll protoplasts of Medicago sativa. Plant Cell Reports. 5, 468-470.
 - 28.- Dos Santos, A.V.P., Outka, D.E., Davey, M.R. 1980. Organogenesis and somatic embryogenesis in tissues derived from leaf protoplasts and leaf explants of Medicago sativa. Z. Pflanzenphysiologie. 99, 261-270.
 - 29.- Dos Santos, A.V.P., Cutter, G.C. y Davey, M.R. 1983. Origin and development of somatic embryos in Medicago sativa L. (Alfalfa). Protoplasma. 117, 107-115.
 - 30.- Dustan, D.I., Short, K.C., Merrick, M.A. y Collin, H.A. 1982. - Origin and early growth of celery embryoids. New Phytology. 91, 212-228.
 - 31.- Durzan, D.J. 1980. Prospects for the mass propagation of economi

- cally important conifers by cell and tissue culture. In: Plant cell cultures: Results and perspectives. Sala, F., Parisi, B., Cella, R. y Ciferri, O. (Eds.). Elsevier/North-Holland Biomedical Press. Amsterdam. p. 283-288.
- 32.- Feirer, R.P., Mignon, G. y Litvay, J.D. 1984. Arginine decarboxylase and polyamines required for embryogenesis in the wild carrot. *Science*. 223, 1433-1434.
- 33.- Feirer, R.P., Wann, S.R. y Einspahr, D.W. 1985. The effects of spermidine synthesis inhibitors on in vitro plant development. *Plant Growth Regulation*. 3, 312-327.
- 34.- Franklin, L. y Moss, R.D. 1981. Microencapsulation of living cells and tissues. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 70 (4): 351-354.
- 35.- Fravel, D.R., Marois, J.J., Lumsden, R.D. y Connick, W.J. Jr. 1985. Encapsulation of potential biocontrol agents in an alginate-clay matrix. *Phytopathology*. 75 (5): 774-777.
- 36.- Fridriksson, S. y Bolton, J.L. 1963. Development of the embryos of Medicago sativa L. after normal fertilization and after pollination by other species of Medicago. *Can. J. Bot.* 42, 23-33.
- 37.- Fujii, D.S. 1982. In vitro propagation of celery (Apium graveolens L.). M.S. Dissertation, University of California, Davis.
- 38.- Fujii, J.A., Slade, D.T., Redenbaugh, K. y Walker, K.A. 1987. Artificial seeds for plant propagation. *Trends in Biotechnology*. 5 (12): 335-339.
- 39.- Fujimura, T. y Komamine, A. 1979. Synchronization of somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Plant Physiol.* 64, 162-164.
- 40.- Gamborg, O., Miller, R. y Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50, 151-158.
- 41.- García, B. y Arellano, S.J. 1988. Inmovilización de células de

- Capsicum chinese L. para la producción de capsaicinoides. Tesis profesional. Escuela Nacional de Estudios Profesionales unidad Iztacala, México. (En revisión).
- 42.- Giuliano, G.D., Rosellini, D. y Terzi, M. 1983. A new method for the purification of the different stages of carrot embryoids. Plant Cell Reports. 2, 216-218.
- 43.- Glicksman, M. 1969. Pectins. In: Gum technology in the food industry. Academic Press. New York. p. 159-190.
- 44.- Gisby, P.E. y Hall, D.O. 1980. Biophotolitic H₂ production using alginate-immobilized chloroplasts, enzymes and synthetic catalysts. Nature. 287, 651-657.
- 45.- Groose, R.W. y Bingham, E.T. 1984. Variation in plants regenerated from tissue culture of tetraploid alfalfa heterozygous for several traits. Crop Science. 24, 655-658.
- 46.- Gupta, P.K. y Durzan, D.J. 1987. Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plant regeneration in loblolly pine. Bio/technology. 5, 147-151.
- 47.- Hasley, L.H. y White, J.M. 1980. Influence of raw and coated seeds on production of carrots in relation to seeder device. Hortscience. 15 (2): 142-144.
- 48.- Hernández, Ma. V.P. 1988. Estudio histoquímico e histológico de la ontogenia de embriones somáticos de alfalfa (Medicago sativa L.) línea A 70.34. Tesis profesional. Escuela Nacional de Estudios Profesionales unidad Zaragoza, México. (en revisión).
- 49.- Hu, C.Y. y Wang, F.J. 1983. Meristem, shoot tip and bud cultures. In: Handbook of plant cell culture. V.1. Evans, D.A., Sharp, W.R., Ammirato, P.V. y Yamada Y.-(Eds.). MacMillan Publishing Co. New York. p. 177-227.
- 50.- Itamunoala, G.F. 1987. Effective diffusion coefficients in calcium alginate gel. Biotechnology Progress. 3 (2): 115-120.
- 51.- Jacobsen, J.V. y Pressman, E. 1979. A structural study of ger-

- mination in celery (Apium graveolens L.) seed with emphasis on endosperm breakdown. *Planta*. 144, 241-248.
- 52.- Johansen, A. y Flink, J.M. 1986. A new principle for immobilized yeast reactors based on internal gelation of alginate. *Bio technology Letters*. 8 (2): 121-126.
- 53.- Johnson, L.B., Stuteville, D.L., Higgins, K., Skinner, K.Z. - 1981. Regeneration of alfalfa plants from protoplasts of selected Regen S clones. *Plant Science Letters*. 20 (4): 297-304.
- 54.- Kao, K.N. 1977. Chromosomal behaviour in somatic hybrids of soy bean-Nicotiana glauca. *Molec. Gen. Genet*. 150, 225-230.
- 55.- Kao, K.N. y Michayluk, M.R. 1980. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of alfalfa. *Z. Pflanzenphysiol*. 96, 135-141.
- 56.- Kao, K.N. y Michayluk, M.R. 1981. Embryoid formation in alfalfa cell culture from different plants. *In vitro*. 17 (7): 645-648.
- 57.- Kaya, K.H. y Nelsen, C.E. 1985. Encapsulation of steinernematid and heterorhabditid nematodes with calcium alginate; A new approach for insect control and other applications. *Environmental Entomology*. 14 (4): 572-574.
- 58.- Kierstan, M. y Bucke, C. 1977. The immobilization of microbial cells, subcellular organelles, and enzymes in calcium alginate gels. *Biotechnology and Bioengineering*. 19, 387-397.
- 59.- Kitto, S.L. y Janick, J. 1980. Water soluble resins as artificial seed coats. *Hortscience*. 15 (3): 439.
- 60.- Kitto, S.L. y Janick, J. 1981. Testing artificial seed coats - for asexual embryos. *Hortscience*. 16 (3): 452.
- 61.- Kitto, S.L. y Janick, J. 1982. Polyox as an artificial seed coat for asexual embryos. *Hortscience*. 17 (3): 488.
- 62.- Kitto, S.L. y Janick, J. 1983. ABA and chilling increase survival of asexual carrot embryos encapsulated with artificial seed coats. *Hortscience*. 18 (4): 618.

- 63.- Kitto, S.L. y Janick, J. 1985. Production of synthetic seeds by encapsulating asexual embryos of carrot. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110 (2): 277-282.
- 64.- Kitto, S.L. y Janick, J. 1985a. A citrus embryo assay to screen water-soluble resins as synthetic seed coats. *Hortscience.* 20 (1): 98-100.
- 65.- Kitto, S.L. y Janick, J. 1985b. Hardening treatments increase survival of synthetically-coated asexual embryos of carrot. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110 (2): 283-286.
- 66.- Knorr, D. 1984. Use of chitinous polymers in food: A challenge for food research and development. *Food Technology.* 38 (1): 85.
- 67.- Knorr, D., Miazga, M.S. y Teutonico, A.R. 1985. Immobilization and permeabilization of cultured plant cells. *Food Technology.* 39 (10): 135-142.
- 68.- Kumaraswamy, M.D., Rao, K.P., Joseph, K.T. y Santappa, M. 1981. Immobilization of enzymes on alginate acid-polyacrylamide copolymers. *Biotechnology and Bioengineering.* 13, 1889-1892.
- 69.- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature.* 227, 680-685.
- 70.- Lesins, K. y Gillies, C.B. 1972. Taxonomy and cytogenetics of Medicago. In: *Alfalfa Science and Technology.* Hanson, H.G. - (Ed.). American Society of Agronomy Inc. p. 53-83.
- 71.- Linsmaier, E.M. y Skoog, F. 1965. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 18, 100-127.
- 72.- Litz, R.E. 1987. Application of tissue culture to vegetable crop improvement. In: *Plant tissue and cell culture.* V. 3. Green, C. E., Somers, D.A., Hacksttt, W.P. y Biesboer, D.D. (Eds.). Alan R. Liss inc. New York. p. 407-418.
- 73.- Litz, R.E. y Scheffer, B. 1987a. Polyamines in adventitious and somatic embryogenesis in mango (Mangifera indica L.). *J. Plant Physiol.* 128, 251-258.

- 74.- Loschiavo, F. 1984. A critical review of the procedures for embryo purification. *Plant Molecular Biology Reporter*. 2 (3): - 15-18.
- 75.- Luna, S.R. 1987. Cultivo de células en suspensión. En: *Cultivo de tejidos vegetales*. Hurtado, D.V.M. y Merino, Ma. E.M. - (Eds.). Trillas. México. p. 122-132.
- 76.- Lupotto, E. 1983. Propagation of an embryogenic culture of Medicago sativa L. *Z. Pflanzenphysiol.* 11 (2): 95-104.
- 77.- Lutz, J.D., Wong, J.R., Rowe, J., Tricoli, D.M. y Lawrence, R. H. 1985. Somatic embryogenesis for mass cloning of crop plants. In: *Tissue culture in forestry and agriculture*. Henke, R.R., Hughes, K.W., Constantin, M.S. y Hollaender, A. (Eds.). Plenum Press. New York. p. 105-116.
- 78.- Lycett, G.W. et al. 1984. The complete nucleotide sequence of a legumin gene from legumes. *Nucl. Acids Res.* 12, 4493-4506.
- 79.- Magaña, I.P. 1987. (Información personal). Centro de Investigación y Estudios Avanzados. I.P.N. Zacatenco. México.
- 80.- Matteau, P.P. y Saddler, J.N. 1982. Continuous glucose production using encapsulated mycelial-associated B-glucosidase from Trichoderma E58. *Biotechnology Letters*. 4 (11): 715-720.
- 81.- McCoy, T.J. y Walker, K. 1984. Alfalfa. In: *Handbook of plant cell tissue culture*. V. 2. Macmillan Publishing Co. New York. p. 171-192.
- 82.- Meijer, E.G.M. y Brown, D.C.W. 1987. Role of exogenous nitrogen and sucrose in rapid high frequency somatic embryogenesis in Medicago sativa. *Plant cell, tissue and organ culture*. 10, 11-19.
- 83.- Meijer, E.G.M. y Brown, D.C.W. 1987a. A novel system for rapid high frequency somatic embryogenesis in Medicago sativa. *Physiol plantarum*. 69, 591-596.
- 84.- Millier, W.F. 1971. Progress report on seed pellets. *New York's food and life sciences*. 4 (2&3): 13-15.

- 85.- Millier, W.F. y Bensin, B.F. 1974. Tailoring pelleted seeds coatings to soil moisture conditions. New York's food and life sciences. 7 (1): 20-23.
- 86.- Mitten, D.H., Sato, S.J. y Skokut, T.A. 1984. In vitro regenerative potential of alfalfa germplasm sources. Crop Science. - 24, 943-945.
- 87.- Montes, Ma. C.H. y Magaña I.P. 1987. Deshidrogenación del compuesto S de Reichstein por células de Arthrobacter simplex inmovilizadas. Memorias II Congreso nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Cd. de Durango. México. p. 54.
- 88.- Moreno, S. 1984. Análisis físico y biológico de semillas. U.-N.A.M. p. 254-263.
- 89.- Morris, E.R., Rees, D.A. y Young, G. 1982. Chiroptical characterization of polysaccharide secondary structures in the presence of interfering chromophores; Chain conformation of inter-junction sequences in calcium alginate gels. Carbohydrate Research. 108, 181-195.
- 90.- Moshy, R.J. 1985. Impact of biotechnology on food product development. Food Technology. 39 (10): 113-118.
- 91.- Mullan, C. 1987. Curso: Diferentes procesos de inmovilización por microencapsulación. Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología. U.N.A.M. Cuernavaca. México.
- 92.- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15, 473-497.
- 93.- Murashige, T. 1978. The impact of plant tissue culture on agriculture. In: Frontiers of plant tissue culture. Thorpe, T.A. (Ed.). The International Association for Plant Tissue Culture. p. 22.
- 94.- Nagarajan, P., Mckenzie, J.S. y Walton, P.D. 1986. Embryogenesis and plant regeneration of Medicago spp. in tissue culture. Plant

Cell Reports. 5, 77-80.

- 95.- Nagarajan, P. y Walton, P.D. 1987. A comparison of somatic chromosomal instability of tissue culture regenerants from Medicago sativa Pers. Plant Cell Reports. 6, 109-113.
- 96.- Navarro, E.S.U. 1985. Obtención y multiplicación masiva de clavel (Dianthus caryophyllus L.) libre de virus a partir del cultivo in vitro de meristemas apicales de tallo. Tesis profesional. U.N.A.M. Facultad de Ciencias. p. 103.
- 97.- Novak, F.J. y Konečná. 1982. Somatic embryogenesis in callus and cell suspension cultures of alfalfa (Medicago sativa). Z. Pflanzenphysiol. 105 (3): 279-284.
- 98.- Orton, T.J. 1984. Celery. In: Handbook of plant cell culture. V. 2. Sharp, W.R., Evans, D.A., Ammirato, P.V. y Yamada, Y. -- (Eds.). Macmillan Publishing Co. New York, p. 243-267.
- 99.- Paredes, L.O. 1986. Biotecnología de plantas: Una herramienta estratégica en los programas alimentarios de México. Ciencia y Desarrollo. 68, 27-43.
- 100.- Rappaport, L., Fujii, D.S. y Thompson, R.H. 1980. From cells to celery: Callus formation and plant regeneration in tissue and liquid suspension culture. Hortscience. 15, 416.
- 101.- Redenbaugh, K., Nichol, J., Kessler, M.E. y Paasch, B. 1984. Encapsulation of somatic embryos for artificial seed production. In vitro. 20, 256-257.
- 102.- Redenbaugh, K., Viss, P., Slade, D. y Fujii, J. 1986. Scale-up: Artificial seeds. In: VI International congress of plant tissue and cell culture. Somers, D.A., Gengenbach, B.G., Biesboer, D. D., Hackett, W.P. y Green, L.E. (Eds.). University of Minnesota. Minneapolis, Minnesota. U.S.A. p. 132.
- 103.- Redenbaugh, K., Paasch, D.B., Nichol, W.J., Kessler, E.M., Viss, R.P. y Walker. A.K. 1986a. Somatic seeds: Encapsulation of asexual plant embryos. Bio/technology. 4, 797-801.

- 104.- Redenbaugh, K., Viss, P., Slade, D. y Fujii, J.A. 1987. Scale up: Artificial seeds. In: Plant tissue and cell culture. V. 3. Green, C.E., Somers, D.A., Hackett, W.P. y Biesboer, D.D. (Eds.) Alan R. Liss Inc. New York. p. 473-493.
- 105.- Redenbaugh, K., Slade, D. y Fujii, J.A. 1987a. Desiccated analogs of botanic seed. U.S. patent 8704044. In: Biotechnology advances: Research reviews and patent abstracts. 5 (2): 425.
- 106.- Rehg, T., Dorger, C. y Chau, C.P. 1986. Application of an atomizer in producing small alginate gel beads for cell immobilization. Biotechnology Letters. 8 (2): 111-114.
- 107.- Reinert, J., Backs, D. y Krosing, M. 1966. Faktoren der embryogenese in gewe bekulturen aus kulturformen von Umbelliferen. Flanta. 68, 375-378.
- 108.- Reisch, B. y Bingham, E.T. 1980. The genetic control of bud formation from callus cultures of diploid alfalfa. Plant Science - Letters. 20, 71-77.
- 109.- Reisch, B. y Bingham, E.T. 1981. Plants from ethionine-resistant alfalfa tissue cultures: Variation in growth and morphological characteristics. Crop Science. 21, 783-788.
- 110.- Rochefort, B.W., Rehg, T. y Chau, C.P. 1986. Trivalent cation stabilization of alginate gel for cell immobilization. Biotechnology Letters. 8 (2): 115-120.
- 111.- Roos, E.E. y Moore, F.D. 1975. Effect of seed coating on performance of lettuce seeds in greenhouse soil tests. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 100 (5): 573-576.
- 112.- Sachs, M., Cantliffe, D.J. y Nell, T.A. 1981. Germination studies of clay-coated sweet pepper seeds. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 106 (3): 385-389.
- 113.- Sachs, M., Cantliffe, D.J. y Nell, T.A. 1982. Germination behavior of sand-coated sweet pepper seed. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 107 (3): 412-416.

- 114.- Schaefer, J. 1985. Regeneration in alfalfa tissue cultures: Characterization of intracellular pH during somatic embryo production by solid-state P-31 NMR. *Plant Physiol.* 79 (3): 584-589.
- 115.- Schenk, R.U. y Hildebrandt, A.C. 1972. Medium and Techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous cell cultures. *Can. J. Bot.* 50, 199-204.
- 116.- Sharp, W.R., Sondhal, M.R., Caldas, L.S. y Maraffa, S.B. 1980. The physiology of in vitro asexual embryogenesis. *Hortic. Rev.* 2 (77): 268-310.
- 117.- Sharp, W.R., Evans, D.A. y Ammirato, P.V. 1984. Plant genetic engineering: designing crops to meet food industry specifications. *Food Technology.* 38 (2): 112-119.
- 118.- Sharples, G.C. 1978. Interaction of moisture potential and activates carbon on lettuce seed germination. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 103 (1): 135-137.
- 119.- Sharples, G.C. y Gentry, S.P. 1980. Lettuce emergence from vermiculite seed tablets containing activated carbon and phosphorus. *Hortscience.* 15 (1): 73-75.
- 120.- Sharples, G.C. 1981. Lettuce seed coatings for enhanced seedling emergence. *Hortscience.* 16 (5): 661-662.
- 121.- Skokut, A.T., Manchester, J. y Schaefer, J. 1985. Regeneration in alfalfa tissue culture: Stimulation of somatic embryo production by amino acids and N-15 NMR determination of nitrogen utilization. *Plant Physiol.* 79 (3): 579-583.
- 122.- Slightom, J.L. y Chee, P.P. 1987. Advances in the molecular biology of plant seed storage proteins. *Biotechnology Advances.* 5 (1): 29-45.
- 123.- Sondahl, M.R. y Sharp, W.R. 1977. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of Coffea arabica L. *Z. Pflanzenphysiol.* 81, 395-408.

- 124.- Stanford, E.H., William, C.M. y Binham, E.T. 1972. Cytology and evolution of the Medicago sativa-falcata complex. In: Alfalfa Science and Technology. Hanson, C.H. (Ed.). American Society of Agronomy. U.S.A. p. 87-89.
- 125.- Stavarek, S.J., Croughan, T.P. y Rains, D.W. 1980. Regeneration of plants from long-term cultures of alfalfa cells. Plant Science Letters. 19, 253-261.
- 126.- Stirn, S. y Jacobsen, H.J. 1987. Marker proteins for embryogenic differentiation patterns in pea callus. Plant Cell Reports. 6, 50-54.
- 127.- Stuart, D., Nelsen, J., Strickland, G.S. y Nichol, W.J. 1985. Factors affecting developmental processes in alfalfa cell cultures. In: Tissue culture in forestry and agriculture. Henke, R.R., Hugues, K.W., Constantin, M.S. y Hollaender, A. (Eds.). Plenum Press. New York. p. 59-73.
- 128.- Styer, D.J. 1985. Bioreactor technology for plant regeneration. In: Tissue culture in forestry and agriculture. Henke, R.R., - Hugues, K.W., Constantin, M.S. y Hollaender, A. (Eds.). Plenum Press. New York. p. 117-130.
- 129.- Sung, Z.R. y Okimoto, R. 1981. Embryonic proteins in somatic embryos of carrot. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78 (6): 3683-3687.
- 130.- Sung, Z.R., Fienberg, A., Chorneau, R., Borkird, C., Furner, I. y Smith, J. 1984. Developmental biology of embryogenesis from carrot culture. Plant Molecular Biology Reporter. 2 (3): 3-14.
- 131.- Tiwayang, P. y Kosaki, M. 1982. Lactic acid production by a new Lactobacillus sp., Lactobacillus vaccinostercus Kosaki and Okada sp., nov., immobilized in calcium alginate. J. Ferment. Technol. 60 (6): 595-598.
- 132.- Tisserat, B., Esan, E.B. y Murashige, T. 1979. Somatic embryogenesis in angiosperms. In: Horticultural Reviews. Janick, J. (Ed.) V. 1. A.V.I. Publishing Westport Conn. p. 1-78.

- 133.- Towle, G.A. y Christensen, O. 1973. Pectin. In: Industrial Gums polysaccharides and their derivates. 2a. edición. Academic Press. New York. p. 159-190.
- 134.- Tran, V.N. y Cavanagh, A.K. 1984. Structural aspects of dormancy. In: Seed physiology. V. 2. Murray, D.R. (Ed.). Academic Press. Australia. p. 1-44.
- 135.- Uchimiya, R. y Murashige, T. 1974. Evolution of parameters in the isolation of viable protoplasts from cultured tobacco cells. Plant Physiology. 54, 936-944.
- 136.- USDA, 1979. Semillas, anuario de agricultura. C.E.C.S.A. México. p. 271-295.
- 137.- Vega, A.E.G. 1987. Embriogénesis somática en apio (Apium graveolens L. tipo Tall Utah 52-70). Tesis profesional. U.N.A.M. Facultad de Ciencias. México. 79 p.
- 138.- Vijayalakshmi, M., Marcipar, A., Segard, E. y Broun, G.B. 1979. Matriz-bound transition metal for continuous fermentation tower packing. Annals of the New York Academy of Sciences. 326, 249-254.
- 139.- Villegas, T.L. 1986. Developmental study of somatic embryogenesis in Medicago sativa. Research proposal to the department of Biology. University of Ottawa. Canadá. 27 p.
- 140.- Villegas, T.L. y Brown, D.C.W. 1987. Developmental study of somatic embryogenesis in Medicago sativa L. (En revisión).
- 141.- Villegas, T.L. 1988. (Comunicación personal). Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. I.P.N. México.
- 142.- Walker, K.A., Wendeln, M.L., Jaworski, E.G. 1979. Organogenesis in callus tissue of Medicago sativa: The temporal separation of induction processes from differentiation processes. Plant Science Letters. 16, 23-30.
- 143.- Walker, K.A. y Sato, S.J. 1981. Morphogenesis in callus tissue of Medicago sativa: The role of ammonium ion in somatic embryogenesis.

- genesis. Plant cell, tissue and organ culture. 1, 109-121.
- 144.- Watts, M.J., Galpin, I.J. y Collin, H.A. 1984. The effect of growth regulators, light and temperature on flavour production in celery tissue cultures. New Phytol. 98, 583-591.
- 145.- Williams, L. y Collin, R.A. 1976. Embryogenesis and plant formation in tissue cultures of celery. Annals of Botany. 40, 325-332.
- 146.- Windholz, M. 1975. The Merck Index. Ninth edition. Merck and Co, Inc. Rahway, N.J. U.S.A. p. 134.
- 147.- Zee, S. y Wu, S.C. 1979. Embryogenesis in the petiole explants of chinese celery (Apium graveolens). Z. Pflanzenphysiol. 93, 325-335.

Apéndice I

Medios basales; MS (Murashige y Skoog, 1962), MS mod. (Meijer y - Brown, 1987), SH (Schenk y Hildebrandt, 1972) y B₅e (Villegas y - Brown, 1987, modificado de Gamberg et al., 1968).

MACRONUTRIENTES	MS (mg/l)	MS mod. (mg/l)	SH (mg/l)	B ₅ e (mg/l)
NH ₄ NO ₃	1650	400	--	--
KNO ₃	1900	3538	2500	2528
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	370	400	500
KH ₂ PO ₄	170	--	--	--
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	--	--	--	150
NH ₄ H ₂ PO ₄	--	--	300	--
(NH ₄) ₂ .cit. dibásico	--	--	--	2827
CaCl ₂ ·2H ₂ O	332	332	751	151
MICRONUTRIENTES				
KI	0.88	0.88	1	0.75
H ₃ BO ₃	6.2	6.2	5	3
MnSO ₄ ·H ₂ O	16.9	16.9	10	10
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.5	8.5	1	2
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.25	0.1	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.025	0.2	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.025	0.1	0.025
Na ₂ EDTA	37.3	37.3	20.1	37.3
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	27.8	14.9	27.8
VITAMINAS				
Acido nicotínico	0.5	0.5	5.0	1.0
Piridoxina-HCl	0.5	0.5	0.5	1.0
Tiamina-HCl	1.0	1.0	5.0	10.0
Neo-inositol	100	100	100	100
Glicina	2.0	2.0	--	--
Adenina	--	--	--	1.0