

28  
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**EXPRESION Y ACUMULACION DE MATERIAL DE  
RESERVA EN EMBRIONES SOMATICOS DE ALFALFA  
(Medicago sativa L.)**

TESIS PROFESIONAL  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I O L O G O  
P R E S E N T A :  
ANA MARIA ESTHER CIBRIAN TOVAR

MEXICO, D. F.

FALLA DE ORIGEN

1991



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

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

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

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

## INDICE GENERAL

i	INDICE DE FIGURAS.....	I
ii	RESUMEN.....	VII
I.	INTRODUCCION.....	1
II.	OBJETIVOS.....	4
II.1	OBJETIVOS GENERALES.....	4
II.2	OBJETIVOS PARTICULARES.....	4
III.	ANTECEDENTES.....	6
III.1.	GENERALIDADES DE Medicago sativa L.....	6
III.2.	EMBRIOGENESIS SEXUAL EN ALFALFA.....	8
III.2.1.	GAMETOFITO FEMENINO.....	8
III.2.2.	POLINIZACION Y DIVISION CELULARES.....	9
III.3.	DESARROLLO DE LAS TECNICAS in vitro.....	11
III.4.	FUNDAMENTOS DE LA MICROPROPAGACION POR CULTIVO DE TEJIDOS.....	11
III.5.	VIAS DE MICROPROPAGACION Y SU IMPORTANCIA.....	13
III.6.	EMBRIOGENESIS SOMATICA.....	14
III.7.	CARACTERISTICAS DE LA EMBRIOGENESIS.....	16
III.8.	EMBRIOGENESIS SOMATICA EN LA ALFALFA.....	16
III.9.	ETAPAS DE LA EMBRIOGENESIS SOMATICA EN LA ALFALFA.....	19
III.9.1.	INDUCCION.....	19
III.9.2.	DESARROLLO.....	19
III.9.3.	CONVERSION.....	21
III.10.	DESARROLLO EMBRIONARIO in vitro vs in vivo.....	21
III.11.	SISTEMAS MODELO DEL DESARROLLO EMBRIONARIO in vitro.....	24

III.12.	PROBLEMAS EN EMBRIOGENESIS SOMATICA.....	25
III.13.	PROTEINAS DE RESERVA EN SEMILLAS.....	26
III.13.1.	FORMACION DE LOS CUERPOS PROTEICOS.....	29
III.14.	ORGANIZACION Y EXPRESION DE LOS GENES DE LAS PROTEINAS DE RESERVA.....	30
III.15.	TECNICAS ANALITICAS PARA EL ESTUDIO DE LAS PROTEINAS DE RESERVA.....	31
III.16.	CARBOHIDRATOS.....	34
III.17.	AGENTES INDUCTORES DE EXPRESION Y/O ACUMULACION DE MATERIALES DE RESERVA EN SISTEMAS in vitro.....	35
III.17.1	ACIDO ABCSCISICO.....	36
III.17.2	SORBITOL.....	38
III.17.3	EXTRACTO DE EMBRIONES SEXUALES INMADUROS DE ALFALFA (EEC).....	39
IV.	MATERIALES Y METODOS.....	40
IV.1.	MATERIAL VEGETATIVO.....	40
IV.2.	CULTIVO in vitro.....	40
IV.2.1.	MEDIOS EMPLEADOS.....	40
IV.2.2.	DESINFESTACION DEL MATERIAL VEGETATIVO.....	40
IV.2.3.	MANEJO DEL MATERIAL VEGETATIVO.....	41
IV.2.4.	INOCULACION.....	41
IV.2.5.	CONDICIONES DE INCUBACION.....	41
IV.2.6.	PROTOCOLO DE CULTIVO in vitro.....	41
IV.2.7.	GERMINACION DE LOS EMBRIONES SOMATICOS (ES).....	42
IV.3.	SEPARACION DE EMBRIONES SOMATICOS POR CENTRIFU- GACION EN GRADIENTES DE DENSIDAD DISCONTINUA DE SACAROSA.....	43
IV.3.1.	PREPARACION DE LOS GRADIENTES.....	43
IV.3.2.	COSECHA DE LOS CALLOS C/EMBRIONES SOMATICOS.....	44

IV.4.	EXTRACCION DE LAS PROTEINAS DE RESERVA DE SEMILLAS Y ES DE ALFALFA A7034.....	45
IV.4.1.	PROTOCOLO PARA LA EXTRACCION DE PROTEINAS DE RESERVA EN SEMILLAS DE Medicago sativa L.....	46
IV.4.2.	EXTRACCION DE LAS GLOBULINAS 7S Y 11S.....	47
IV.4.3.	PROTOCOLO DE EXTRACCION DE LAS PROTEINAS DE RESERVA DE EMBRIONES SOMATICOS DE ALFALFA.....	48
IV.5.	CUANTIFICACION DE PROTEINAS.....	49
IV.6.	CARACTERIZACION DE LAS PROTEINAS DE RESERVA.....	51
IV.6.1.	ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA Y SDS..	51
IV.6.2.	ISOELECTROENFOQUE.....	53
IV.6.3.	ELECTROFORESIS EN DOBLE DIMENSION (O'Farrel).....	54
IV.6.4.	ANALISIS INMUNOELECTROFORETICO DE LAS PROTEINAS DE RESERVA.....	56
IV.6.5.	"ROCKET" INMUNOELECTROFORESIS.....	58
IV.6.6.	DETERMINACION DE ACTIVIDAD HIDROLITICA DE ALFA-AMILASA.....	60
IV.7.	CINETICA DE DESARROLLO.....	62
IV.7.1.	CONDICIONES EXPERIMENTALES.....	62
IV.8.	MANIPULACIONES DE MEDIO.....	65
IV.8.1.	SORBITOL.....	65
IV.8.2.	ACIDO ABCSISICO.....	67
IV.8.3.	EXTRACTO DE EMBRIONES SEXUALES INMADUROS.....	69
IV.9.	APENDICES.....	71
V.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	77
V.1.	SISTEMA DE EMBRIOGENESIS SOMATICA DE LA ALFALFA in vitro.....	77
V.2.	SEPARACION DE EMBRIONES SOMATICOS POR CENTRIFUGACION EN GRADIENTE DE DENSIDAD DISCONTINUA DE SACAROSA.....	81

V.3.	REPRODUCIBILIDAD DEL METODO DE EXTRACCION DE PROTEINAS DE RESERVA EN SEMILLAS Y ES DE ALFALFA.....	82
V.4.	CUANTIFICACION DE PROTEINAS.....	85
V.5.	CARACTERIZACION DE LAS PROTEINAS DE RESERVA EN SEMILLAS Y EMBRIONES SOMATICOS DE ALFALFA.....	86
V.5.1.	ELECTROFORESIS EN SDS-PAGE.....	87
V.5.2.	ISOELECTROENFOQUE.....	94
V.5.3.	ELECTROFORESIS EN DOBLE DIMENSION (O'Farrel).....	94
V.6.	CINETICA DE DESARROLLO EMBRIONARIO.....	97
V.6.1.	EVALUACION DE LAS CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DEL CULTIVO.....	97
V.6.2.	EVALUACION DE LA RESPUESTA EN LOS CULTIVOS DE EMBRIONES SOMATICOS.....	100
V.6.3.	EVALUACION DEL RENDIMIENTO EN LOS CULTIVOS DE EMBRIONES SOMATICOS.....	101
V.6.4.	EVALUACION DEL CRECIMIENTO EN LOS CULTIVOS DE EMBRIONES SOMATICOS.....	103
V.6.5.	¿ EN PESO DE LAS DIFERENTES FRACCIONES EMBRIONARIAS.....	104
V.6.6.	CONTENIDO DE PROTEINAS DE LAS DIFERENTES FRACCIONES EMBRIONARIAS.....	106
V.6.7.	RELACION ALBUMINAS/GLOBULINAS.....	112
V.6.8.	PATRONES POLIPEPTIDICOS DE LAS GLOBULINAS DE LOS DIFERENTES ESTADIOS DE DESARROLLO.....	115
V.6.9.	ROCKET INMUNOELECTROFORESIS DE LAS MUESTRAS DE LA CINETICA.....	126
V.6.10.	CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS DE LAS DIFERENTES FRACCIONES EMBRIONARIAS.....	132
V.7.	MANIPULACIONES DE MEDIO.....	137
V.7.1.	RESULTADOS SORBITOL.....	137
V.7.1.1.	RESPUESTA.....	137
V.7.1.2.	RENDIMIENTO.....	138

V.7.1.3.	CRECIMIENTO.....	140
V.7.1.4.	GERMINACION.....	141
V.7.1.5.	% EN PESO DE LAS FRACCIONES EMBRIONARIAS.....	143
V.7.1.6.	CONTENIDO DE PROTEINAS SORBITOL.....	146
V.7.1.7.	RELACION ALBUMINAS/GLOBULINAS.....	149
V.7.1.8.	CARACTERIZACION DE LAS PROTEINAS DE RESERVA EN ES CULTIVADOS CON SORBITOL .....	150
V.7.1.9.	ROCKET INMUNOELECTROFORESIS.....	153
V.7.2.	RESULTADOS ACIDO ABSICISICO.....	155
V.7.2.1.	RESPUESTA.....	155
V.7.2.2.	RENDIMIENTO.....	156
V.7.2.3.	CRECIMIENTO.....	157
V.7.2.4.	GERMINACION.....	158
V.7.2.5.	% EN PESO DE LAS FRACCIONES EMBRIONARIAS.....	159
V.7.2.6.	CONTENIDO DE PROTEINAS.....	161
V.7.2.7.	RELACION ALBUMINAS/GLOBULINAS.....	164
V.7.2.8.	CARACTERIZACION DE LAS PROTEINAS DE RESERVA EN ES CULTIVADOS CON ABA $10^{-5}$ M.....	166
V.7.2.9.	ROCKET INMUNOELECTROFORESIS.....	166
V.7.3.	RESULTADOS CON EXTRACTO DE EMBRIONES SEXUALES INMADUROS (EEC).....	169
V.7.3.1.	RESPUESTA.....	169
V.7.3.2.	RENDIMIENTO.....	170
V.7.3.3.	CRECIMIENTO.....	172
V.7.3.4.	GERMINACION.....	173
V.7.3.5.	% EN PESO DE LAS FRACCIONES EMBRIONARIAS.....	174
V.7.3.6.	CONTENIDO DE PROTEINAS.....	176

<b>W.7.3.7.</b>	<b>RELACION ALBUMINAS/GLOBULINAS.....</b>	<b>181</b>
<b>W.7.3.8.</b>	<b>CARACTERISTICAS DE LAS PROTEINAS DE RESERVA EN ES CULTIVADOS EN ES CULTIVADOS CON EEC.....</b>	<b>183</b>
<b>W.7.3.9.</b>	<b>ROCKET IMMUNOELECTROPHORESIS.....</b>	<b>188</b>
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>192</b>
<b>VII.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA CITADA.....</b>	<b>197</b>

## I. INDICE DE FIGURAS

Fig. No. 1	Representación diagramática de la embriogénesis en las leguminosas.....	10
Fig. No. 2	Representación esquemática de la embriogénesis somática en <u>Medicago sativa</u> .....	20
Fig. No. 3	Estadios del desarrollo embrionario en la alfalfa....	23
Fig. No. 4	Niveles de respuesta y rendimiento en callos de alfalfa.....	79
Fig. No. 5	% de germinación de embriones somáticos a 15 y 30 días.....	80
Fig. No. 6	Gradiente de densidad discontinua de sacarosa.....	81
Fig. No. 7	Reproducibilidad del método de extracción de globulinas.....	83
Fig. No. 8	Patrones polipectídicos de las proteínas de reserva de alfalfa en 2 lotes de semillas diferentes.....	84
Fig. No. 9	Linearidad de los métodos de cuantificación de proteína por Bradford y Lowry.....	86
Fig. No. 10	SDS-PAGE de las diferentes fracciones proteicas de semillas de alfalfa.....	87
Fig. No. 11	Distancias de migración promedio de marcadores de bajo peso molecular en geles de SDS-PAGE.....	88
Fig. No. 12	Patrones característicos de la globulina 11 S de semillas de alfalfa.....	90
Fig. No. 13	Patrones característicos de la globulina 7 S de semillas de alfalfa.....	91
Fig. No. 14	Patrones característicos de las globulinas embriones somáticos.....	92
Fig. No. 15	Tabla comparativa de patrones polipectídicos.....	92
Fig. No. 17	Isoelectroenfoque en tubo de las globulinas 7 S y 11 S de semillas de alfalfa.....	95
Fig. No. 18 (O'Farrel)	Electroforesis de SDS-PAGE en doble dimensión de la globulina 7 S.....	96
Fig. No. 19	Electroforesis de SDS-PAGE en doble dimensión (O'Farrel) de la globulina 11 S.....	96

Fig. No. 20	Cinética de respuesta de ES en fotoperíodo y oscuridad.....	101
Fig. No. 21	Cinética de rendimiento de ES en fotop. y oscuridad.....	102
Fig. No. 22	Cinética de crecimiento de ES en fotop. y oscuridad.....	103
Fig. No. 23	Cinética de % de peso fresco en fotoperíodo.....	104
Fig. No. 24	Cinética de % de peso fresco en oscuridad.....	105
Fig. No. 25	Cinética de % de peso fresco en fotoperíodo.....	105
Fig. No. 26	Cinética de % de peso fresco en oscuridad.....	106
Fig. No. 27	Contenido de albúminas en fotoperíodo durante la cinética de desarrollo.....	108
Fig. No. 28	Contenido de albúminas en oscuridad durante la cinética de desarrollo.....	108
Fig. No. 29	Contenido de globulinas en fotoperíodo durante la cinética de desarrollo.....	109
Fig. No. 30	Contenido de globulinas en fotoperíodo durante la cinética de desarrollo.....	109
Fig. No. 31	Cinética de albúminas en fotoperíodo.....	110
Fig. No. 32	Cinética de globulinas en fotoperíodo.....	110
Fig. No. 33	Cinética de albúminas en oscuridad.....	111
Fig. No. 34	Cinética de globulinas en oscuridad.....	111
Fig. No. 35	Índices de la relación albúminas/globulinas durante la cinética de desarrollo en fotoperíodo.....	113
Fig. No. 36	Índices de la relación albúminas/globulinas durante la cinética de desarrollo en oscuridad.....	113
Fig. No. 37	Relación albúminas/globulinas en los diferentes estadios de desarrollo de la cinética en fotoperíodo.....	114
Fig. No. 38	Relación albúminas/globulinas en los diferentes estadios de desarrollo de la cinética en oscuridad.....	114
Fig. No. 39	Patrones polipeptídicos de las albúminas y globulinas del estadio corazón-globular en fotoperíodo.....	121
Fig. No. 40	Patrones polipeptídicos de las albúminas y globulinas del estadio torpedo joven en fotoperíodo.....	121

Fig. No. 41	Patrones polipeptídicos de las albúminas y globulinas del estadio torpedo maduro en fotoperiodo.....	122
Fig. No. 42	Patrones polipeptídicos de las albúminas y globulinas del estadio torpedo tardío en fotoperiodo.....	122
Fig. No. 43	Patrones polipeptídicos de las albúminas y globulinas del estadio corazón-globular en oscuridad.....	123
Fig. No. 44	Patrones polipeptídicos de las albúminas y globulinas del estadio torpedo joven en oscuridad.....	123
Fig. No. 45	Patrones polipeptídicos de las albúminas y globulinas del estadio torpedo maduro en oscuridad.....	124
Fig. No. 46	Patrones polipeptídicos de las albúminas y globulinas del estadio torpedo tardío en oscuridad.....	124
Fig. No. 47	Patrones polipeptídicos de las albúminas y globulinas del estadio cotiledonar en oscuridad.....	125
Fig. No. 48	"Rocket" inmunolectroforesis de los extractos de callos de la cinética de desarrollo en fotoperiodo..	129
Fig. No. 49	"Rocket" inmunolectroforesis de los extractos de embriones corazón-globular en fotoperiodo.....	129
Fig. No. 50	"Rocket" inmunolectroforesis de los extractos de embriones torpedo joven en fotop. y oscuridad.....	130
Fig. No. 51	"Rocket" inmunolectroforesis de los extractos de ES torpedo tardío y cotiledonar en fotoperiodo.....	130
Fig. No. 52	"Rocket" inmunolectroforesis de los extractos de embriones cotiledonar en oscuridad.....	131
Fig. No. 53	Placa de agar-almidón para determinación de actividad hidrolítica de alfa-amilasa.....	132
Fig. No. 54	Actividad hidrolítica de alfa-amilasa de la cinética en fotoperiodo.....	132
Fig. No. 55	Actividad hidrolítica de alfa-amilasa de la cinética en oscuridad.....	133
Fig. No. 56	Tratamiento de sorbitol. Respuesta de ES a los 35 y 42 días de cultivo.....	138
Fig. No. 57	Tratamiento de sorbitol. Rendimiento de ES a los 35 y 42 días de cultivo.....	139
Fig. No. 58	Tratamiento de sorbitol. Crecimiento de ES a los 35 y 42 días de cultivo.....	140

Fig. No. 59	Tratamiento de sorbitol. † Germinación de ES a los 35 y 42 días de cultivo.....	142
Fig. No. 60	Tratamiento de sorbitol. † de peso fresco del tratamiento de sorbitol a los 35 días.....	143
Fig. No. 61	Tratamiento de sorbitol. Gráfica de † en peso fresco del tratamiento de sorbitol a los 35 días.....	144
Fig. No. 62	Tratamiento de sorbitol. † de peso fresco del tratamiento de sorbitol a los 42 días.....	144
Fig. No. 63	Tratamiento de sorbitol. Gráfica de † en peso fresco del tratamiento de sorbitol a los 42 días.....	145
Fig. No. 64	Tratamiento de sorbitol. Niveles de albúminas y globulinas a los 35 días.....	147
Fig. No. 65	Tratamiento de sorbitol. Niveles de albúminas y globulinas a los 42 días.....	148
Fig. No. 66	Tratamiento de sorbitol. Relación albúminas/globulinas a los 35 días.....	149
Fig. No. 67	Tratamiento de sorbitol. Relación albúminas/globulinas a los 42 días.....	150
Fig. No. 68	Tratamiento de sorbitol. SDS-PAGE de abúminas a los 35 días.....	151
Fig. No. 69	Tratamiento de sorbitol. SDS-PAGE de globulinas a los 35 días.....	151
Fig. No. 70	Tratamiento de sorbitol. SDS-PAGE de globulinas a los 42 días.....	152
Fig. No. 71	Tratamiento de sorbitol. "Rocket" inmunolectroforesis de globulinas a los 35 días.....	154
Fig. No. 72	Tratamiento de sorbitol. "Rocket" inmunolectroforesis de globulinas a los 42 días.....	154
Fig. No. 73	Tratamiento con ABA. Respuesta de ES a los 35 y 42 días.....	155
Fig. No. 74	Tratamiento con ABA. Rendimiento de ES a los 35 y 42 días de cultivo.....	156
Fig. No. 75	Tratamiento con ABA. Crecimiento de ES a los 35 y 42 días de cultivo.....	158
Fig. No. 76	Tratamiento con ABA. † de germinación de ES a los 35 y 42 días de cultivo.....	159

Fig. No. 77	Tratamiento con ABA. % de peso fresco de los diferentes estadios embrionarios a los 35 y 42 días de cultivo.....160
Fig. No. 78	Tratamiento con ABA. Gráfica de % de peso fresco de ES a los 35 y 42 días de cultivo.....160
Fig. No. 79	Tratamiento con ABA. Niveles de albúminas y globulinas a los 35 días de cultivo.....162
Fig. No. 80	Tratamiento con ABA. Niveles de albúminas y globulinas a los 42 días de cultivo.....163
Fig. No. 81	Tratamiento con ABA. Relación albúminas/globulinas a los 35 y 42 días de cultivo.....164
Fig. No. 82	Tratamiento con ABA. Gráficas de los índices de albúminas/globulinas a los 35 y 42 días.....165
Fig. No. 83	Tratamiento con ABA. SDS-PAGE de albúminas y globulinas a los 35 días de cultivo.....167
Fig. No. 84	Tratamiento con ABA. SDS-PAGE de albúminas y globulinas a los 42 días de cultivo.....167
Fig. No. 85	Tratamiento con ABA. "Rocket" inmunolectroforesis de las globulinas a los 35 días.....168
Fig. No. 86	Tratamiento con ABA. "Rocket" inmunolectroforesis de las globulinas a los 42 días.....168
Fig. No. 87	Tratamiento con EEC. Respuesta de ES a los 28, 35 y 42 días de cultivo.....170
Fig. No. 88	Tratamiento con EEC. Rendimiento de ES a los 28, 35 y 42 días de cultivo.....171
Fig. No. 89	Tratamiento con EEC. Crecimiento de ES a los 28, 35 y 42 días de cultivo.....172
Fig. No. 90	Tratamiento con EEC. % de germinación a los 28, 35 y 42 días de cultivo.....174
Fig. No. 91	Tratamiento con EEC. % de peso fresco de los diferentes estadios de desarrollo a los 28, 35 y 42 días.....175
Fig. No. 92	Tratamiento con EEC. Gráfica de % de peso fresco a los 28, 35 y 42 días de cultivo.....175
Fig. No. 93	Tratamiento con EEC. Niveles de albúminas y globulinas a los 28 días.....178

Fig. No. 94	Tratamiento con EEC. Niveles de albúminas y globulinas a los 35 días.....	179
Fig. No. 95	Tratamiento con EEC. Niveles de albúminas y globulinas a los 42 días.....	180
Fig. No. 96	Tratamiento con EEC. Relación albúminas/globulinas a los 28, 35 y 42 días.....	181
Fig. No. 97	Tratamiento con EEC. Gráfica de la relación albúminas/globulinas a los 28, 35 y 42 días.....	182
Fig. No. 98	Tratamiento con EEC. SDS-PAGE de albúminas y globulinas del tratamiento de autoclave a los 28 días.....	185
Fig. No. 99	Tratamiento con EEC. SDS-PAGE de albúminas y globulinas del tratamiento de filtración a los 28 días.....	185
Fig. No. 100	Tratamiento con EEC. SDS-PAGE de albúminas y globulinas del tratamiento de filtración a los 35 días.....	186
Fig. No. 101	Tratamiento con EEC. SDS-PAGE de albúminas y globulinas del tratamiento de autoclave a los 35 días.....	186
Fig. No. 102	Tratamiento con EEC. SDS-PAGE de albúminas y globulinas del tratamiento de filtración a los 42 días.....	187
Fig. No. 103	Tratamiento con EEC. SDS-PAGE de albúminas y globulinas del tratamiento de autoclave a los 42 días.....	187
Fig. No. 104	Tratamiento con EEC. "Rocket" inmunolectroforesis de las globulinas de ES a los 28 días.....	190
Fig. No. 105	Tratamiento con EEC. "Rocket" inmunolectroforesis de las globulinas de ES a los 35 días.....	190
Fig. No. 106	Tratamiento con EEC. "Rocket" inmunolectroforesis de las globulinas de ES a los 35 días.....	191

## ii. RESUMEN

La producción masiva de plantas de interés comercial o agrícola, se ha tratado de alcanzar durante años mediante el empleo de diversas técnicas de cultivo tradicional con las que se han obtenido escasos resultados y en las que se ha invertido mucho tiempo y recursos. Recientemente la biotecnología ha propuesto métodos novedosos que han demostrado ser eficaces y confiables en algunas de las especies probadas. Uno de éstos métodos es la embriogénesis somática *in vitro*, la cual ha sido muy útil en la propagación de algunas especies vegetales, en algunas de las cuales se ha logrado establecer exitosamente.

Esta propagación controlada y masiva ha sido dirigida principalmente hacia algunas especies de la familia Leguminosae, por su gran importancia alimentaria y agrícola, siendo uno de los objetivos principales el alcanzar una alta calidad de los productos del cultivo *in vitro*, lo que significa que se requiere establecer las condiciones de cultivo que garanticen un control adecuado de la expresión genética de éstos embriones y un desarrollo y crecimiento normales como plantas. Los principales indicadores de la expresión genética y del valor nutricional de los embriones sexuales y somáticos son los materiales de reserva (proteínas y carbohidratos).

En la presente investigación se propone el uso y caracterización del sistema de embriogénesis somática de la alfalfa A7034 var. Reagenlander para:

1.- Caracterizar las proteínas de reserva presentes en las semillas y embriones somáticos (ES), de la alfalfa A7034, a fin de establecer el grado de similitud de los patrones polipeptídicos de dichas proteínas en éstos dos sistemas.

2.- Determinar los cambios en los patrones polipeptídicos establecidos así como en los diferentes parámetros de calidad del cultivo como son; respuesta, rendimiento, crecimiento y germinación, en cada uno de los estadios embrionarios presentes durante todo el desarrollo de la embriogénesis somática. De tal manera que se pueda conocer cuales son los cambios más importantes de éstos ES a nivel morfológico, fisiológico y bioquímico, y en que tiempo ocurren.

3.- La utilización de algunos agentes que aplicados exógenamente al medio de cultivo durante el desarrollo puedan provocar cambios en la calidad del cultivo y de las proteínas que se pretenden obtener en los mismos. Los agentes seleccionados para esta investigación fueron Sorbitol a concentraciones de 2, 8 y 12 % p/v, ABA  $10^{-5}$  M y Extracto de embriones sexuales inmaduros (EEC), a una concentración de 2 g/l.

Inicialmente se determinaron las características de la embriogénesis somática después de 1 ciclo de recurrencia en condiciones de cultivo basales, las cuales resultaron ser muy similares a lo reportado por otros autores en cuanto a sus características morfológicas, índices de respuesta, rendimiento, crecimiento y germinación

Una vez establecido lo anterior, se procedió a la extracción cuantificación y caracterización parcial de las proteínas de reserva presentes en éstos ES y en las semillas, demostrando simultáneamente que los métodos empleados para éstos análisis eran adecuados y reproducibles. Con éstos resultados, se evidenciaron las diferencias de los patrones polipeptídicos entre las proteínas obtenidas de semillas y las obtenidas de los ES.

De éstos experimentos se observó que los patrones polipeptídicos característicos de los embriones sexuales se presentan también en los embriones somáticos, demostrando así que éstos últimos efectivamente sintetizan las mismas proteínas que las semillas y que principalmente éstas corresponden con las globulinas cuyo coeficiente de sedimentación es de 7 S y 11 S. Por lo anterior se pretendió conocer como cambian los patrones polipeptídicos de éstas proteínas durante el desarrollo de los embriones somáticos y poder así evaluar parcialmente la expresión genética de éstos embriones durante el desarrollo in vitro.

Con éstos resultados se diseñó una cinética de desarrollo en la que se colectaron poblaciones de ES correspondientes a cada uno de los estadios de desarrollo presentes (los cuales fueron separados mediante un gradiente de densidad discontinua de sacarosa), a diferentes tiempos del cultivo in vitro y fueron analizados en todos sus parámetros de calidad y características más importantes como: respuesta, rendimiento, crecimiento, germinación, contenido de proteínas (cuantificación por Bradford), identificación de las mismas mediante SDS-PAGE, "Rocket" inmunoelectroforesis, coeficiente albuminas/globulinas y contenido de carbohidratos (determinado indirectamente por la actividad hidrolítica de la alfa-amilasa)

Los ensayos del experimento de la cinética de desarrollo fueron realizados para cultivos en condiciones de fotoperíodo y oscuridad con el objeto de determinar si alguna de éstas condiciones favorecía o no el desarrollo de la embriogénesis somática in vitro y además el contenido y calidad de las proteínas de reserva de los embriones así obtenidos.

Con este experimento se pudo confirmar que el cultivo en fotoperíodo provoca un mejor desarrollo de los embriones somáticos y una mayor concentración de proteínas de reserva con los patrones característicos de las obtenidas a partir de

la semilla, que los embriones somáticos obtenidos en los cultivos de oscuridad, por lo que se decidió continuar todos los ensayos en fotoperíodo.

Una vez que se determinaron los cambios en el contenido de proteínas de reserva de los diferentes estadios de desarrollo que se presentan durante la embriogénesis somática y se ubicaron los momentos en los que éstos ocurren, se trató de provocar un efecto en la calidad del cultivo y en el almacenamiento de las proteínas de reserva en ES, mediante el uso de los agentes antes mencionados en los medios de cultivo empleados para el desarrollo in vitro.

En el análisis de los embriones somáticos de los diferentes estadios de desarrollo así obtenidos, se determinaron y evaluaron los mismos parámetros de calidad del cultivo y contenido de sus proteínas de reserva, que en el caso de los embriones somáticos obtenidos durante la cinética de desarrollo.

Los resultados de éstos experimentos fueron muy importantes pues se obtuvieron niveles de proteínas de reserva específicas más altos con las manipulaciones probadas (suplementando el medio con EEC), que los obtenidos con las fracciones embrionarias del cultivo en condiciones basales, además éstas proteínas presentaron patrones polipeptídicos muy claros y similares a los obtenidos en la semilla y fueron reconocidas claramente por la inmunolectroforesis en "Rocket".

De las manipulaciones probadas, los resultados muestran que las correspondientes a ABA y Sorbitol pueden dar resultados interesantes modificando el protocolo experimental, sin embargo, la manipulación más exitosa resultó ser la de EEC tanto en calidad del cultivo como en cantidad y calidad de las proteínas de reserva obtenidas.

Así la presente investigación deja planteadas algunas alternativas de cultivo que sería interesante probar en éste sistema de embriogénesis somática de la alfalfa (cuyo conocimiento nos ha llevado ya a considerarlo como un sistema modelo), a fin de obtener aún mayores niveles de acumulación de proteínas de reserva en éstos embriones, mediante la utilización de los agentes aquí planteados o bien con otros. También se señala la importancia de profundizar los estudios de identificación y caracterización de los carbohidratos presentes en éstos embriones y la necesidad de conocer un poco más de las rutas metabólicas que éstos siguen en sistemas in vitro. Ya que éstos materiales de reserva han sido poco estudiados en éstos sistemas y ofrecen un vasto potencial como indicadores bioquímicos del desarrollo vegetal.

## I. INTRODUCCION

Durante los últimos 20 años las técnicas de cultivo de tejidos vegetales han tenido un desarrollo impresionante que han permitido el establecimiento de numerosos sistemas de cultivo in vitro, que han sido aplicados con buenos resultados para una gran variedad de especies. Este gran avance ha contribuido y seguirá contribuyendo al conocimiento básico de la biología de las plantas, así como al objetivo pragmático de resolver algunos problemas agrícolas y hortícolas de nuestro país. Esta es pues, una tecnología biológica de gran potencial económico que ya ha cobrado un gran auge a nivel mundial y que en México puede desarrollarse plenamente si se ofrece un mayor apoyo económico a los valiosos recursos humanos con que contamos.

Lo que el cultivo de tejidos vegetales, abarca es un conjunto de técnicas para cultivar en condiciones asépticas y controladas, cualquier tipo de estructura vegetal que pueda desarrollarse mediante diversos procesos y dar origen a nuevas plantas completas fenotípicamente idénticas o no a la(s) planta(s), de la(s) que se tomaron los explantes. En esta propiedad de regeneración controlada, es donde radica el potencial del cultivo in vitro.

Hay 5 áreas fundamentales donde el cultivo de tejidos vegetales es aplicable y de gran utilidad:

- micropropagación
- preservación de germoplasma
- mejoramiento genético
- biosíntesis de metabolitos
- investigación básica

En todos y cada uno de estos puntos falta mucho conocer de los procesos vegetales en las diferentes plantas de interés económico y ornamental, sin embargo los avances en la investigación de todos ellos son continuos. Por otra parte, todos ellos justifican de manera clara el trabajo que aquí se presenta pues de alguna manera, este estudio incide en cada uno de estos puntos.

Una consideración importante y objetiva de esta idea de incrementar la calidad de proteína por manipulaciones genéticas de cualquier cultivo, depende de nuestro entendimiento del control genético, el cual determina la calidad y cantidad de la proteína sintetizada in vivo e in vitro. Estos estudios del control de los mecanismos de la transcripción y traducción de la información genética, requieren el empleo de técnicas de biología molecular, que no

serían útiles si primero no se caracteriza el proceso a nivel morfológico, fisiológico y bioquímico.

Es esencial la caracterización de las proteínas de reserva y los aspectos regulatorios de su síntesis, siguiendo los cambios en los patrones de proteína durante los diferentes estadios del desarrollo embrionario.

Así, éstos estudios sirven para ubicar y caracterizar los puntos regulatorios de la expresión genética como es la síntesis de las proteínas de reserva, la cual representa la expresión tejido-específica de unos pocos genes en un punto espacial y temporal determinado del ciclo de vida de un organismo.

Un aspecto concerniente con el impacto económico de este tipo de trabajos es el desarrollo de tecnologías para la producción de semillas somáticas. Esto es embriones obtenidos *in vitro* que sean capaces de germinar normalmente y dar origen a plantas productivas. Estos embriones deben además ser producidos en grandes cantidades y tener un tiempo de almacenamiento similar al de las semillas.

La idea de clonar plantas a escala comercial, puede ser aplicable en muchas especies vegetales. Esta tecnología podría ser usada para mejorar variedades de alfalfa (y otras especies).

Un cultivar de alfalfa podría ser evaluado por su producción agronómica, seleccionado y clonado sin polinización cruzada, y sólo se requeriría entonces de un proceso tradicional de estabilización genética (mejoramiento clásico), que toma algunos años con cultivos forrajeros como la alfalfa. Así podría utilizarse una mezcla de los métodos de propagación convencionales y los de biotecnología para obtener mejores variedades a corto plazo.

Los ES son similares en morfología a los embriones cigóticos (EC) y en condiciones adecuadas de cultivo es muy probable que también correspondan en algunas de sus características bioquímicas y fisiológicas más importantes. Los ES pueden ser regenerados *in vitro*, en grandes cantidades sin recombinación genética, lo cual permite tener un control máximo del genotipo elegido.

Una idea que muchos investigadores tienen en mente, es que el alto valor estratégico de los granos y semillas, particularmente el de algunos cereales y leguminosas, los sitúa en un lugar prioritario para intentar modificar genéticamente la calidad de sus proteínas componentes. Es por esta razón que todos los esfuerzos se encaminan a incidir en el control de la regulación y expresión genética de éstas plantas de las que depende en gran medida el suministro de alimento de consumo animal y humano.

Es indudable que la aplicación intensiva y conjunta de las técnicas tradicionales de fitomejoramiento y de las técnicas de ingeniería genética y cultivos vegetales in vitro, resultaría adecuada para la obtención de los cultivos básicos y de los cultivos con alto potencial alimentario resistentes a factores ambientales adversos, con altos rendimientos y alta eficiencia en la incorporación de los nutrimentos presentes en el suelo. En cada uno de éstos puntos, es sin embargo, necesario investigar los indicadores bioquímico-fisiológicos que puedan servir para evaluar la calidad de los cultivos de manera eficiente y sencilla en las primeras generaciones y etapas del desarrollo de las plantas. Estos podrían ser, entre otros, aminoácidos, enzimas específicas o los patrones polipeptídicos de las proteínas de reserva. (Paredes L. O. 1985.)

## II. OBJETIVOS

### II.1 OBJETIVOS GENERALES

- I. Caracterizar las proteínas de reserva presentes en semillas y embriones somáticos de alfalfa (Medicago sativa L. var Reagenlander, línea A7034).
- II. Estudiar la expresión de los materiales de reserva durante el desarrollo de los embriones somáticos.
- III. Determinar si la acumulación del material de reserva de los embriones somáticos de alfalfa en desarrollo, puede ser afectada epigenéticamente.
- IV. Establecer las condiciones de cultivo, bajo las cuales se produzcan embriones somáticos de alta calidad.

### II.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- I.1. Cuantificar, caracterizar e identificar las proteínas de reserva obtenidas de semilla y de los embriones somáticos, mediante técnicas colorimétricas, electroforéticas e inmunológicas, a fin de compararlas entre sí.
  - I.2. Estandarizar el método de extracción de las proteínas de reserva presentes tanto en embriones somáticos como en semillas de alfalfa.
  - I.3. Separar y cuantificar carbohidratos de reserva de semillas y embriones somáticos y posteriormente caracterizarlos.
  - I.4. Determinar presencia y actividad hidrolítica de alfa-amilasa, en semillas y embriones somáticos.
- 
- II. 1. Evaluar cambios en la cantidad y calidad de las proteínas presente en diferentes estadios de desarrollo de los embriones somáticos, ubicando los momentos de síntesis y degradación mediante una cinética de desarrollo.
  - II.2. Seguir los cambios en la actividad de alfa-amilasa durante el desarrollo.

- II.3. Determinar si hay o no, alguna relación entre los momentos de máxima síntesis y/o degradación de las proteínas de reserva, con los niveles de alfa-amilasa durante el desarrollo embrionario.
- III.1. Determinar el efecto del sorbitol a concentraciones de 2, 8 y 12 % en los ES en desarrollo.
- III.2. Determinar que efecto tiene el ABA a una concentración de  $10^{-5}$  M, en el desarrollo de los ES.
- III.3. Determinar si el extracto de embriones sexuales inmaduros de alfalfa, favorece o no, la síntesis y acumulación de materiales de reserva durante la embriogénesis somática.
- III.4. Evaluar el efecto de cada manipulación de medio, tanto en luz como en oscuridad en relación al contenido y calidad de proteínas y a los niveles de carbohidratos.
- IV.1. Ubicar cual es el mejor tratamiento o tratamientos defasados en el tiempo, para obtener una mayor acumulación de proteínas de reserva en los embriones somáticos.
- IV.2. Comparar nivel, patrón de acumulación y características de las proteínas y carbohidratos de reserva obtenidos de los ES en la mejor manipulación de medio, con el control de semilla.

### III. ANTECEDENTES.

#### III.1 GENERALIDADES DE Medicago sativa L.

La alfalfa (Medicago sativa L.), pertenece a la familia Leguminosae, la subfamilia Papilionoideae o Lotoideae y la tribu trifoleaceae. El género Medicago cuenta con alrededor de 62 especies y un gran número de variedades (Lesins y Gillies, 1972), las cuales han derivado principalmente de la mezcla de las especies M. sativa y M. falcata.

Estas especies presentan diferentes características y capacidades adaptativas, y de acuerdo con la clasificación de los centros de origen de las plantas cultivadas elaborada por Vavilov en 1951, se considera como centro de origen de Medicago sativa el Cercano Oriente y Asia Central, esto es, la zona que abarca Turquía, Irán, Irak y Afganistán, y el Suroeste de la Unión Soviética. Y se menciona como centro de origen para Medicago falcata; la zona montañosa de Transcaucasia que abarca los límites entre Europa y Asia y el norte de Siberia.

Esta leguminosa es una planta perenne arbustiva con alturas de entre 60 y 90 cm. Con hojas compuestas e imparipinadas. Las flores (de 8 a 10 mm de longitud), son pentámeras y dispuestas en racimo. Sus colores van desde el amarillo oscuro en M. falcata, hasta el púrpura violáceo o azul en M. sativa (Pliego, 1989). Su fruto es una vaina espiralada de 2 a 5 mm de diámetro con semillas de 4 a 8 mm de longitud, las cuales pueden permanecer en latencia por largos periodos (hasta 10 años) (Lesins and Gillies, 1972).

La dispersión del polen se realiza por el conocido mecanismo de "disparo", provocado por algunos insectos (principalmente del género Apis), el viento, la lluvia o el calor (Pliego, 1989).

Las condiciones ambientales más favorables para el crecimiento de la alfalfa son: temperaturas entre 18 y 28°C, aunque se desarrollan mejor en lugares más templados que cálidos, en suelos ligeramente arcillosos con una buena proporción de fósforo y calcio y en sitios con alta intensidad luminosa y humedad relativa baja (un alfalfar requiere una cantidad de agua de entre 700 y 800 Kg de agua por Kg de materia seca). Pliego, 1989).

Al igual que muchos miembros de la familia Leguminosae, la alfalfa puede establecer asociación simbiótica mutualista con bacterias del suelo del género Rhizobium y lo hace específicamente con Rhizobium meliloti. (Burton, 1972).

En general la alfalfa se comporta como autotetraploide, y al igual que muchas otras plantas forrajeras de polinización cruzada tiene un alto grado de heterocigosis (Atanassov y Brown, 1984). Esta leguminosa posee un número cromosómico (2n) de 32.

La alfalfa es en la actualidad la leguminosa forrajera más ampliamente cultivada en todo el mundo, ha colonizado muy diferentes climas y tipos de suelo y se ha desarrollado exitosamente en éstos.

Algunos factores determinantes que mucho han contribuido a esto son:

- Su capacidad para fijar nitrógeno, conferida por su asociación con Rhizobium.
- El desarrollo radicular profundo de Medicago sativa, le permite resistir a fuertes cambios de temperatura y humedad. La alfalfa cuenta con una raíz gruesa que alcanza hasta 9 mts. de profundidad).
- Su alta variabilidad genética por su condición de alógama.
- La interacción de las especies resultantes de la relación M. falcata y M. sativa.

Recientemente se calculó que hay más de 33 millones de hectáreas de cultivo de alfalfa en todo el mundo, América del Norte es la zona geográfica de mayor superficie cultivada contando con el 40.39 % de la superficie mundial sembrada y distribuido entre EEUU (33.78 %), Canadá (6.112 %) y México (0.49 %). En México, se destinan aprox. 160 000 ha al cultivo de la alfalfa (Del Pozo Ibañez, 1977; Pliego, 1989).

La gran importancia que este cultivo tiene para el hombre, esta basada en que es el principal alimento del ganado bovino, ovino y caprino y constituye por lo tanto la principal fuente de proteína para la producción de carne y alimentos de origen animal (Pernollet, 1985).

Posee un alto contenido proteico de buena calidad y altos rendimientos (comparativamente con los de otros cultivos forrajeros), así como una importante acción nitrificante del suelo (Hamilton and Vanderstoep, 1979; Pernollet and Mossé, 1983).

Sin embargo, su composición de aminoácidos, presenta deficiencia en algunos de ellos como metionina, triptófano y cisteína. Lo que plantea como objetivo de algunos trabajos, el empleo de métodos que incrementen los niveles de proteínas de alta calidad en estas plantas.

### III.2 EMBRIOGENESIS SEXUAL EN ALPALFA

En las plantas superiores, el embrión es la unidad básica en la semilla y representa el inicio de una nueva generación esporofítica (Raghavan, 1976). La embriogénesis, que se refiere a toda la serie de eventos que suceden después de la fertilización, y que involucran el origen, crecimiento y transformación ordenada del cigoto en un embrión; involucra también cambios extensivos en la forma y cambios progresivos desde un estadio de desarrollo inmaduro a uno maduro. Iniciando con la primera división del cigoto, la planta se mantiene en un estado de continua regeneración produciendo nuevas células, tejidos y órganos a lo largo de su vida. Los cambios comunes de la morfología celular durante el desarrollo son división, expansión, madurez, y diferenciación celular, sin embargo, los cambios fisiológicos y bioquímicos que acompañan ésta diferenciación histológica, son probablemente diferentes.

Las semillas de las angiospermas, son un buen sistema experimental para los estudios de la regulación del desarrollo embrionario, ya que en éstas plantas la semilla pasa a través de una sucesión de estados fisio-morfológicos bien definidos que pueden ser utilizados para identificar los momentos de regulación del desarrollo específico y los eventos bioquímicos (Dure, 1975).

En las angiospermas, este proceso comienza con la doble fertilización que da origen al cigoto y al núcleo triploide que a su vez da origen al tejido del endospermo.

Estos eventos tienen lugar en el saco embrionario que está embebido en el tejido materno constituido de tejido nucelar y uno o más integumentos. Este tejido integumentario esta conectado al resto del ovario a través de un funículo en forma de tallo (Dure, 1975).

#### III.2.1 GAMETOFITO FEMENINO:

El gametofito femenino maduro es derivado de una división reductora en la célula madre (megaspóra), seguida por una serie de divisiones mitóticas. En la alfalfa, cuatro megasporas toman parte en la formación del gametofito. El gametofito femenino maduro o saco embrionario tiene comúnmente ocho núcleos haploides genéticamente iguales. En un saco embrionario de este tipo, los núcleos están arreglados en dos cuartetos en los extremos micropilar y de la chalaza. Uno de los núcleos en el extremo micropilar es delimitado por una pequeña cantidad de citoplasma y se organiza a sí misma como célula hueco. Es flanqueada por dos células más pequeñas llamadas sinérgidas. En el extremo de la chalaza, tres núcleos se diferencian como células

antipodales. La célula nuclear puede ser uninucleada o binucleada (Raghavan, 1976).

### III.2.2 POLINIZACION Y DIVISION CELULARES:

Generalmente sólo un tubo polínico penetra en el micrópilo y pasa al saco embrionario, entre la ovocélula y las sinérgidas (éstas 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 2 gametos masculinos cerca de la ovocélula. Un gameto se adhiere al núcleo de esta 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, se forma así, el cigoto el cual es el estado unicelular de un organismo multicelular y las propiedades esenciales de interacciones que se presentan en el adulto, ocurren en esta fase (Stanford et. al. 1972).

El cigoto se divide transversalmente y 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 ocurrida la polinización, el embrión contiene hasta 16 células (Stanford et. al. 1972). Las células del cigoto se dividen en sentido transversal y periclinal para formar una masa esférica (estadio globular), el embrión tiene entonces una simetría radial. Al principio ésta 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 (Raghavan, 1976).

Después, algunos grupos de células laterales opuestos a la periferia del ápice, se transforman en meristemáticos para producir los cotiledones, en este punto el embrión tiene una forma acorazonada. Luego los cotiledones se alargan y ocupan una posición paralela al eje principal y producen el estadio de "torpedo" (Crouch, 1982).

En muchas leguminosas el endospermo es consumido a medida que se forma el eje embrionario y los cotiledones (Dure, 1975).

Este proceso que corresponde al desarrollo inicial de una semilla es resultado del desarrollo rápido del tejido integumentario. Y continúa dando origen a un suspensor (el desarrollo de éste, así como el de la organogénesis del embrión son detenidos tempranamente). El endospermo continúa expandiéndose en tamaño y número celular, seguido después por el propio embrión, el crecimiento del cual se da a expensas del primero. Las células del integumento externo se

diferencian en la testa (cubierta seminal), y en muchos casos, el integumento interno y las células nucelares son perdidas, para la proliferación del endospermo. En algún punto las células del funículo conectan el óvulo al ovario degenerado, haciendo del óvulo un sistema nutricionalmente cerrado (Dure, 1975).

El grado con que el embrión consume el endospermo durante la embriogénesis varía según la especie de angiosperma. La síntesis de proteínas de reserva ocurre en las etapas media y final del desarrollo del embrión (Dure, 1975). Visto como un todo, el desarrollo embrionario y la formación de las semillas en las leguminosas es tan similar entre las especies relacionadas, que es posible esquematizar la secuencia general de los eventos principales. (Fig. 1).

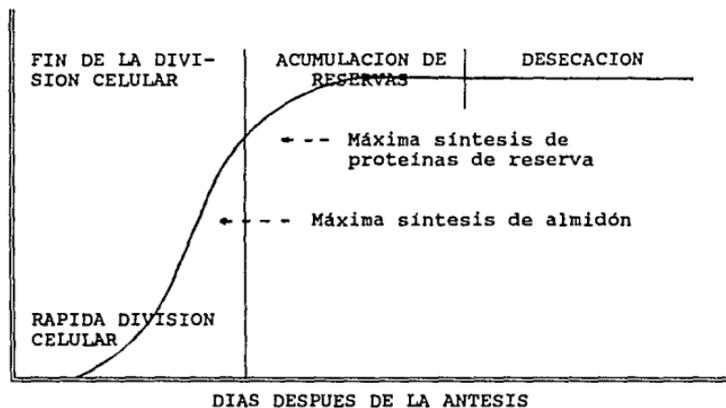


Fig. 1.- Representación diagramática de la embriogénesis en las leguminosas. (Tomado de Dure, 1975).

A diferencia de las semillas de cereales, en las leguminosas, el endospermo no es el sitio primario de acumulación de proteínas de reserva, sino el embrión mismo (Larkins, 1981; Villegas, 1986.). En éstas plantas, los cotiledones funcionan como un depósito eno cotiledones fun almidón y fosfato, y ocupan la cavidad completa. Una vez que la desecación del embrión y del medio que lo rodea comienza, la cubierta seminal se esclerifica y muere, encerrando al embrión en una cubierta protectora (Dure, 1975).

En la madurez, el contenido de humedad de la semilla va de 5 a 15 % de agua, dependiendo de las especies y del ambiente (Adams y Rinne, 1980). En contraste, en las semillas inmaduras, en las que el embrión no ha acumulado reservas, se encuentra un contenido de humedad de entre 80 y 90 %. Conforme el desarrollo de la semilla avanza, su peso seco se incrementa más rápido que su peso fresco, como resultado de la acumulación de reservas y de la disminución de su contenido de agua. Durante la fase final del desarrollo de la semilla (la desecación), el peso fresco decrece y el embrión entra a un período de latencia. Así la madurez de la semilla, se da en un ambiente desecante y la pérdida de agua es una parte normal del desarrollo del embrión, no una situación de estrés (Finkelstein y Crouch, 1986).

### III.3 DESARROLLO DE LAS TECNICAS in vitro

Desde 1930, los avances hechos en el campo de la fisiología vegetal, bioquímica y genética, han tenido mucha influencia en el desarrollo de las técnicas de cultivo de órganos y tejidos bajo condiciones asépticas. Esto ha dado origen a un nuevo enfoque de la biología vegetal, que incluye el control del desarrollo vegetal mediante tratamientos químicos y variación de factores ambientales al experimentar con genotipos elegidos.

Las técnicas de cultivo de tejidos, abren nuevas posibilidades para la propagación in vitro y la manipulación controlada de la expresión de las plantas, por métodos químicos e incluyendo en ocasiones, la inducción de mutaciones por diferentes vías (Negrutiu et al., 1984; King, 1984), pero aún sin manipulaciones; las células in vitro son inestables genéticamente y puede ocurrir variación durante el cultivo. (Larkins y Scowcroft, 1981. Orton, 1983; Toncelli et al., 1985). El empleo de las diversas técnicas de cultivo in vitro depende de los objetivos de cada investigación.

### III.4 FUNDAMENTOS DE LA MICROPROPAGACION POR CULTIVO DE TEJIDOS

Se ha considerado que la mayoría de las células vegetales son totipotentes, esto es que poseen el potencial de producir cualquier tipo celular vegetal, siguiendo los procesos de competencia, determinación y diferenciación, de manera natural o inducida.

Algunas de las sustancias que más se han empleado para inducir algún efecto en el crecimiento vegetal, son las auxinas, citocininas y giberelinas; sin embargo, existen otras sustancias que pueden afectar el crecimiento tales como; agentes inductores de estrés hídrico y osmótico, como

el sorbitol, manitol y polietilenglicol (PEG). Algunos investigadores han suplementado los medios de cultivo con extractos naturales complejos (químicamente indefinidos), con el fin de buscar en éstos extractos, factores que regulen el crecimiento en un sentido específico. Sin embargo, actualmente el uso de éstos extractos está limitado a aquellos casos, en los que los ensayos con medios químicamente definidos, no han resultado satisfactorios o cuando existe una base teórica importante.

Algunos investigadores consideran que la relación de los reguladores del crecimiento, juega un papel muy importante en el control de la embriogénesis somática (Tisserat *et al.* 1979); sin embargo, hay que considerar que éste factor es importante si ya se ha determinado de que genotipo depende la capacidad embriogénica de la especie en cultivo. A este respecto se han elaborado protocolos de cultivo que incluyen la separación temporal de la inducción (fases de competencia y determinación) y el desarrollo (fases de organogénesis y crecimiento), mediante cambios en las condiciones de cultivo (Meijer y Brown, 1987).

La capacidad de las células somáticas para formar embriones como una respuesta a un estímulo apropiado, las hace "competentes" para seguir una vía de desarrollo distinta a la que venían siguiendo. Esta competencia es un prerrequisito para que ocurra la determinación en un sentido específico. En un momento dado, un tejido es competente para algunos procesos de determinación en lugar de para otros, mediante ésta "determinación", es que una célula es restringida a nuevas vías de especialización. Posteriormente ocurre la diferenciación que es el momento en el que células genotípicamente semejantes, difieren en sus programas de expresión, en un mismo punto espacial y temporal (Tiedemann, 1972; Christianson and Warnick, 1983).

Como resultado de la diferenciación, las células de un organismo multicelular se vuelven funcional y estructuralmente diferentes entre sí durante la ontogenia; esto implica tanto el estado fisiológico de una sola célula, como todo un proceso de desarrollo del embrión.

El mecanismo de la diferenciación se ha considerado desde hace un tiempo como uno de los principales problemas en la biología del desarrollo (Sung, 1985), y esto le ha conferido mucha atención al cultivo de células y tejidos vegetales ya que éste ofrece múltiples ventajas para la manipulación controlada de los diferentes sistemas vegetales.

En los cultivos *in vitro*, se inicia la proliferación de células del explante para la formación de tejido calloso, el cual puede seguir alguna de las vías posibles de regeneración tisular; ya sea organogénesis (formación de brotes o rizogénesis), callogénesis o embriogénesis. (Sung, 1985).

Las características generales de crecimiento de un callo, involucran una relación compleja entre el material vegetal usado para iniciar el callo, la composición del medio y las características ambientales durante el periodo de cultivo.

La vía a seguir en un cultivo potencialmente embriogénico (dependiente del genotipo), puede entonces ser definitivamente "inducida" por la remoción o aplicación de diversos agentes en concentraciones críticas en el medio de cultivo. Esta "inducción" entendida en un sentido amplio involucra un cambio en el destino de una célula o grupo de células (Christianson and Warnick, 1983)..

### III. 5 VIAS DE MICROPROPAGACION Y SU IMPORTANCIA

Hay dos vías alternativas principales para la micropropagación:

a) La inducción de brotes y meristemas apicales o radicales (organogénesis), que implica colocar el tejido en un medio de proliferación para inducir la producción y el desarrollo de brotes. Estos son reciclados hasta que se obtiene el nivel de producción deseado, posteriormente los brotes se enraizan y finalmente se aclimatan en invernadero. Esta vía es útil para lograr la micropropagación en poco tiempo pero con menores rendimientos que:

b) La embriogénesis somática, donde células competentes se desarrollan en plantas completas en respuesta a un estímulo ambiental, de manera comparable a los embriones cigóticos, al ser colocados en un medio de cultivo propicio. Con esta vía, se obtienen respuestas y rendimientos muy altos y esto ha sido alcanzada en algunas especies.

Los métodos de cultivo de tejidos, han demostrado tener un gran potencial para la propagación clonal rápida de muchos tipos de plantas. Sin embargo, para considerar a las técnicas de cultivo de tejidos como una herramienta confiable, es necesario conocer la respuesta de varios cultivares para definir cuales de ellos tienen la capacidad de crecer exitosamente en el campo (Nagarajan, et al., 1986).

Debido a esto, numerosos genotipos y variaciones en los nutrientes se han probado hasta ahora con limitado éxito, y los aspectos bioquímicos de la inducción y desarrollo de los embriones somáticos solo han sido estudiados en algunas especies como chícharo (Stirn y Jacobsen, 1987), algodón, zanahoria, alfalfa (Stuart et al. 1985) y Brassica napus (Crouch y Sussex, 1981).

Desde un punto de vista pragmático, la formación de embriones, además de la formación de yemas, tiene una significación especial en el mejoramiento vegetal por vías no convencionales. (Kohlenbach, 1978). La micropropagación de plantas de interés comercial a gran escala, es de gran potencial y actualmente se han logrado establecer un gran número de sistemas de propagación vegetativa in vitro para especies como fresa, papa, espárrago, clavel, jitomate, etc., (Sharp et. al., 1984; Redenbaugh et al. 1986).

Sin embargo, es importante tener un buen control sobre los genotipos empleados, ya que los ciclos de recurrencia, pueden alterar la respuesta y características del cultivo.

### III.6. EMBRIOGENESIS SOMÁTICA

Existen diversos términos para referirse a la embriogénesis asexual (cuando este fenómeno ocurre en la naturaleza), tales como: poliembrionia, apomixis; embriogénesis nucelar, esporofítica, adventicia y somática. Sin embargo en el caso de la embriogénesis in vitro, el término más ampliamente utilizado es el de embriogénesis somática o adventicia, algunos investigadores denominan embriones no cigóticos a los embriones somáticos, debido a que éstos últimos no se originan a partir de una célula huevo o cigoto, producto de la fusión de las células sexuales masculina y femenina.

El desarrollo embrionario a partir de células somáticas ha sido estudiado desde hace algunos años, luego de que en 1958, Reinert evidenció la formación de estructuras aparentemente embrionarias en callos obtenidos por el cultivo de raíces de zanahoria. A partir de entonces surgieron los primeros reportes de regeneración vía embriogénesis somática y hasta la fecha, se han publicado una gran cantidad de trabajos para la obtención de embriones somáticos in vitro en diversas especies.

Algunos de los primeros investigadores, fueron Nomura y Komamine con cultivos en suspensión de zanahoria. De acuerdo con sus primeros estudios, la determinación para la embriogénesis, ocurre durante la transición de las células simples a agregados embriogénicos. Sin embargo, la capacidad de las células individuales para convertirse en embriogénicas, era relacionada únicamente con la morfología celular.

En posteriores estudios, la división desigual de las células somáticas fue determinada como un prerequisite para el desarrollo de los agregados de células embriogénicas, en tanto que la síntesis diferencial de DNA, en los estados

multicelulares, fue asociada con el desarrollo de estos agregados en embriones. (Nomura y Komamine, 1986; Dijak y Simmonds, 1988).

Los embriones somáticos se originan de células esporofíticas y según Kohlenbach en 1978; estas pueden ser de diferentes tejidos:

- 1) Células vegetativas y tejidos de plantas maduras.
- 2) De tejidos reproductivos, estructuras como la nucela y embriones maduros e inmaduros, los cuales con frecuencia son una excelente fuente para la ES.
- 3) De hipocótilos y cotiledones de embriones y plántulas jóvenes, donde los embriones somáticos se originan como adventicios sin pasar por callo.

A diferencia de los animales en los cuales, algunas células jamás pierden el estado embrionario, en las plantas el meristemo floral se desarrolla de meristemos vegetativos, los cuales son considerados como tejidos somáticos. Por lo que el estado embriogénico, tiene que ser "adquirido" durante el desarrollo floral para dar lugar a productos meióticos como el cigoto, que sean embriogénicos (Sung, 1985).

Como ha sido posible observar en muchos sistemas de embriogénesis somática, el estado embriogénico potencial es un estado estable que requiere de algún factor externo que rompa su equilibrio y que inicie la embriogénesis; una vez que esto tiene lugar, los eventos sucesivos se producen rápidamente. (Sung, 1985). El estado embriogénico es mantenido a través del tiempo, de la división celular y aún de la diferenciación celular y está ligado directamente con la respuesta de un cultivo.

Aunque es evidente que en las plantas superiores hay células competentes y determinadas, poco se sabe de éstos procesos (Christianson y Warnick, 1983), porque no todas las células de un inóculo se dividen y terminan su desarrollo en una planta. En algunos callos es posible distinguir diferentes tipos de células; en forma, color, tamaño y textura, por presentar respuesta embriogénica o no (Sondhal y Sharp, 1977), o por tener diferencias en su contenido y/o tipo de proteínas. Como es el caso de callos embriogénicos y no embriogénicos de zanahoria, chícharo y arroz (Stirn y Jacobsen, 1987; Chen y Luthe, 1987).

Algunos autores mencionan que los embriones somáticos (ES), pueden exhibir un comportamiento fisiológico similar al de los embriones sexuales y que inclusive la latencia puede

ser manifestada in vitro; ocurriendo su desarrollo una vez que todos los requerimientos ambientales son provistos. (Murashige, 1979.)

### III.7 CARACTERISTICAS DE LA EMBRIOGENESIS

Los cambios en el patrón de organización celular, conducen a cambios en forma y tamaño del embrión, determinados por la frecuencia y los planos de división celular, así como por la tasa y dirección de la elongación celular. El plano de división es a su vez, determinado por la orientación del huso mitótico (Raghavan, 1976.).

Si bien, hasta ahora no se ha establecido ninguna teoría general sobre la ES que conecte los eventos morfogénéticos que ocurren en un periodo determinado, con los cambios bioquímicos y fisiológicos de los embriones; desde un punto de vista bioquímico, estos fenómenos deberían ser medidos en términos moleculares. Esto significa que el incremento o decremento en los niveles de algunos metabolitos, así como los cambios en las actividades enzimáticas de síntesis y degradación son resultado de la regulación de la expresión genética diferencial.

En los cultivos de tejidos vegetales, la embriogénesis somática puede ocurrir directa o indirectamente, en el primer caso originándose de células aisladas y/o protoplastos. Y en el segundo, requiriendo la mediación de una fase de callo. Si bien no se conoce la naturaleza del estímulo requerido para la embriogénesis directa, es factible pensar que puede ocurrir que las células ya estén predeterminadas para la embriogénesis, y no que requieran ser inducidas para seguir esa vía (Sung, 1985).

### III.8. EMBRIOGENESIS SOMATICA EN LA ALFALFA.

Una de las especies importantes, en donde se han logrado establecer sistemas confiables de micropropagación, vía embriogénesis somática es la alfalfa (Medicago sativa L.) (McCoy y Walker, 1984). Sus ES facilitan el cultivo por su tamaño (2 a 5 mm), y pueden ser obtenidos en relativamente poco tiempo (5 a 7 semanas). Por otro lado, se cuenta ya con bastantes antecedentes de su comportamiento in vitro.

En el caso de la alfalfa, la embriogénesis somática, es lograda por la vía indirecta y se considera que algunos nutrimentos y reguladores de crecimiento como el 2,4-D, son esenciales para la inducción del estado embriogénico. (Sung, 1985). Algunos autores justifican esto porque el 2,4-D inicia la división celular desigual, lo que origina células de diferente tamaño, de éstas, las más pequeñas, dan origen a

densas agrupaciones capaces de generar embriones. (Komamine, et. al., 1984).

Esta especie posee además características muy bien definidas, en cuanto a rendimiento y velocidad de respuesta. Es por esta razón que la investigación realizada en ésta especie es valiosa, tanto para el establecimiento de sistemas modelo de embriogénesis somática, como en el estudio de los procesos que ocurren durante el desarrollo vegetal in vitro e in vivo. Además, obviamente del conocimiento que se pueda aportar de la alfalfa misma.

Los ES de los callos de alfalfa pueden ser obtenidos in vitro, usando como explantes diferentes tejidos incluyendo embriones inmaduros (Reich, 1980; Walker, et al. 1979), pecíolos (Novak and Koněcna, 1982), tallos (Walker, 1979), cotiledones (Novak and Koněcna, 1982; Stavarek, 1980), hipocótilos (Novak and Koněcna, 1982), hojas (Dos Santos et al. 1980) y protoplastos (Mc Coy y Walker, 1984).

En 1985 Brown y Atanasov, probaron 76 cultivares y encontraron que la regeneración de las plantas a partir de tejidos tisulares es dependiente del genotipo. Encontraron una gran variedad de respuestas a la embriogénesis somática. 34 % de los cultivares mostraron algún grado de respuesta en la formación de embriones. La mejor respuesta fue obtenida con la línea Reagenlander, usando el pecíolo como explante, encontrándose que el 80 % de los explantes formaron embriones y el 65 % de éstos germinó.

Este sistema produce embriones saludables bien desarrollados después de 35 días de cultivo en medio B5 (Gamborg, 1968), suplementado con 1 mg/l de 2,4-D y 0.1 mg/l de kinetina, usando 3 % de sacarosa como fuente de carbono (Brown and Atanassov, 1985).

A la fecha la mayor parte del trabajo hecho sobre ES en alfalfa, ha sido realizado con el cultivar Regen S, en particular el clon RA3 el cual ha sido estudiado por Stuart (1985) y Walker (1979).

En 1987, Meijer y Brown, desarrollaron un sistema que permite la separación de las dos etapas (inducción y desarrollo), durante el desarrollo embrionario, utilizando dos diferentes medios de cultivo.

En el cultivar Reagenlander y en la línea Fl.1 Medicago falcata, los primeros embriones fueron visibles en los primeros 15 días después de que el explante fue transferido de medio de cultivo. En éste nuevo sistema, los explantes son cultivados en el medio MS (Murashige et al. 1962), con 22.6  $\mu$ M de 2,4-D y 4.7  $\mu$ M de cinetina por 10 días y después sobre el medio basal MS por 20 días.

En términos generales, la respuesta embriogénica en una especie se ve afectada por diversos factores como el genotipo y edad del inóculo; tipo y concentración de sales inorgánicas y aditivos orgánicos: reguladores del crecimiento y condiciones de incubación.

Anteriormente se consideraba que la regeneración de plantas de alfalfa *in vitro*, era 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). Sin embargo, hay otros factores que considerar como son el balance bioquímico endógeno de diferentes mensajeros, la fisiología y sensibilidad del explante inicial y la variabilidad genética de las poblaciones bajo estudio.

Otras variables que hay que considerar son: la luz, ya que en otros sistemas como el de zanahoria, se han obtenido buenos resultados al hacer los cultivos en oscuridad (Michler y Lineberger, 1987), el origen del explante y la condición fisiológica del tejido original. En sistemas como el de zanahoria, se han realizado estudios del efecto de la luz sobre el desarrollo embrionario, y se ha encontrado que en tratamientos en oscuridad, se produce el mayor número total de embriones (Michler y Lineberger, 1987).

Para el desarrollo se disminuye o eliminan los reguladores del crecimiento. La germinación generalmente se lleva a cabo en un medio sin reguladores. Con respecto a la fuente de carbono se ha verificado que el 3 % de sacarosa usado comúnmente en los medios de cultivo es la concentración mas adecuada.

La naturaleza controlable del cultivo de tejidos y la influencia de factores exógenos, permite lograr un mejor entendimiento de los factores que controlan el desarrollo de las plantas de reproducción sexual.

Otros estudios que se han realizado con éstos sistemas son: Procesos de selección *in vitro*. Croughan *et. al.* en 1978, seleccionó líneas celulares tolerantes a 1 % de NaCl en el medio de cultivo. Por otro lado, Reisch y Bingham en 1981, obtuvieron el desarrollo de plantas resistentes a etionina. Se han realizado también estudios sobre los requerimientos nutricionales del cultivo, encontrándose que se necesita un mínimo de 25 mM de  $\text{NH}_4^+$  para la diferenciación de ES de alfalfa (McCoy y Walker, 1984). La adición de aminoácidos (caseína hidrolizada), mejora la cantidad y probablemente la calidad de los ES (Skokut *et al.*, 1985; 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.

### III.9 ETAPAS DE LA EMBRIOGENESIS SOMATICA EN LA ALFALFA

Existen tres etapas definidas durante el desarrollo embrionario in vitro:

#### III.9.1 INDUCCION

Como ya se mencionó, el proceso de inducción puede ocurrir en una de dos formas: directa o indirectamente; en el primero de los casos, los tejidos de algunas especies sólo requieren ser cultivados en un medio basal para iniciar la generación de embriones (quizá debido a la presencia de células determinadas pre-embriogénicamente), en tanto que en el segundo los tejidos deben ser colocados en un medio más complejo, con reguladores del crecimiento proporcionados exógenamente en la proporción precisa.

La embriogénesis directa, involucra entonces, el cultivo de células ya determinadas que sólo necesitan las condiciones adecuadas para producir ES, sin la intervención de una fase de callo.

Por otro lado, en la embriogénesis indirecta, las células se reproducen formando callo, las células de estos tejidos, pueden encontrarse en estado competente y pasar al estado de determinación, donde pueden en ocasiones observarse estructuras proembrionarias.

#### III.9.2 DESARROLLO

En algunos casos como en la alfalfa, el desarrollo de ES puede lograrse inclusive, en el mismo medio de inducción (Meijer y Brown, 1987).

El desarrollo de ES in vitro presenta los mismos 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 células 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 ES se observan centros de actividad celular que daran 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).

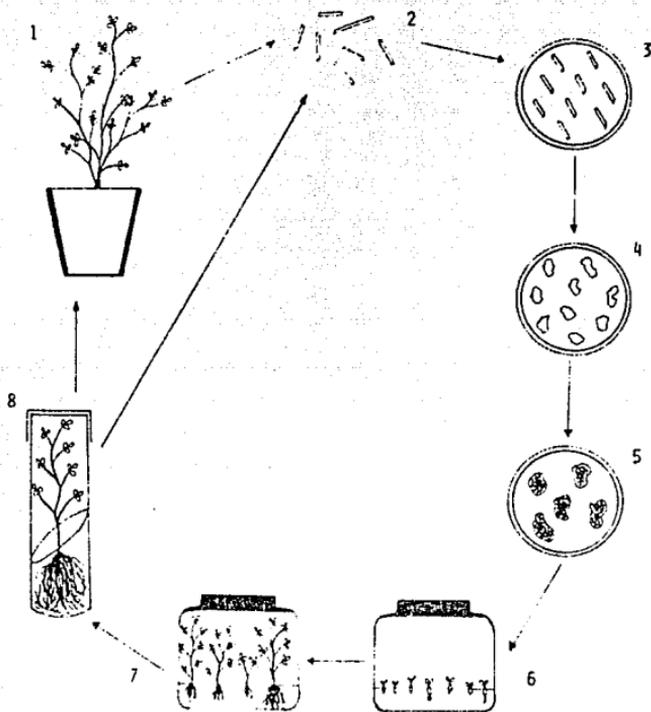


Fig. No. 2. Representación esquemática de la embriogénesis somática en *Medicago sativa*, donde se muestran las etapas del desarrollo embrionario y las diferentes fases de cultivo *in vitro*. 1) Material vegetativo fuente, 2) Explantes, 3) Inducción en medio B5 con reguladores de crecimiento durante 18 días en fotoperíodo, 4) Formación de callos, 5) Desarrollo en medio B5 sin reguladores de crecimiento, 6) Germinación, 7) Desarrollo de plántulas, 8) Aislamiento de plántulas para su posterior transferencia a tierra como material vegetativo fuente.

### III.9.3 CONVERSION

La germinación o conversión de los ES es la última etapa del desarrollo de un embrión para pasar a ser una plántula. En la conversión de los ES generalmente no se requieren reguladores del crecimiento y en ocasiones solo disminuir al 50 % las sales de algún medio de cultivo. Desafortunadamente, la mayoría de los reportes en ES no indican porcentajes de conversión, ni que porcentaje de las plántulas obtenidas, sobreviven en condiciones de invernadero (lo que nos hace suponer que son bajos). Esto es probablemente debido a que no se cuenta con un criterio bioquímico que diagnostique la calidad y vigor de un embrión durante su desarrollo. Con los porcentajes de conversión únicamente se comprueba si los ES obtenidos son de calidad al final de su desarrollo, pero no indica que factores pudieron haberse cambiado durante el mismo, para asegurar su conversión. Este es el objetivo del análisis de proteínas de reserva, utilizarlas como un marcador bioquímico para determinar las condiciones in vitro necesarias en la obtención de ES de alta calidad.

### III.10 DESARROLLO EMBRIONARIO in vitro vs in vivo

En muchas especies, los embriones obtenidos de semillas inmaduras, germinan precozmente. Sin embargo, las plántulas obtenidas a partir de ellos pueden ser anormales (Kohlenbach, 1978).

El desarrollo de una planta sigue por lo menos, dos programas principales. El primero de ellos, es un programa morfogénico en el cual todos los órganos embrionarios son formados, y el segundo es un programa de germinación en el cual el patrón de crecimiento es estimulado.

Esta última fase, es quizá la más precaria en la vida de una planta. Por lo que la embriogénesis puede ser vista como una etapa preparatoria para una germinación exitosa. En este punto radica la importancia de que el embrión cuente con altos niveles de material de reserva. (Dure, 1975). En las leguminosas al igual que en muchas dicotiledóneas, hay una absorción casi total del endospermo durante la embriogénesis. De algún modo puede parecer que estas plantas gastan mucha más energía en la formación de semillas que las monocotiledóneas y que aquellas dicotiledóneas que entran en latencia con la mayoría de sus reservas aun polimerizadas en la nucela/endospermo. Sin embargo en especies como Pisum sativum, Pisum arvense, Phaseolus vulgaris, Phaseolus coccineus, Vicia faba y Glycine max se evita el paso de reempaquetamiento en los cotiledones, ya que en la germinación, los hidrolizados de la nucela/endospermo se mueven hacia el eje en desarrollo (Dure, 1975).

Las dos fases mencionadas pueden ocurrir sucesivamente en el tiempo como en el caso de los embriones somáticos, pero en las angiospermas y gimnospermas más evolucionadas, el desarrollo es interrumpido por la formación de una semilla en la cual el crecimiento ha sido disminuido temporalmente. En estas plantas, hay un tercer programa de desarrollo que conduce a la fase de latencia de la semilla.

Esta latencia no se encuentra en el desarrollo de los embriones somáticos, en estos no hay ninguna fase definida de acumulación de macromoléculas de reserva, por lo que los embriones somáticos continúan su desarrollo y germinan precozmente. El evitar esta germinación precoz es uno de los objetivos que se persiguen al tratar de establecer sistemas de embriogénesis somática, en los cuales se logre inducir una alta tasa de síntesis y/o acumulación de éstas macromoléculas de reserva y además establecer de manera puntual en el tiempo esta acumulación.

Otro aspecto del desarrollo de las semillas y al que sería interesante inducir a los ES, se refiere al cambio metabólico que tiene lugar en el tejido nutricional de reserva, ya sea en el endospermo o en los cotiledones cuando ocurre la germinación. Las células que han sintetizado enormes cantidades de proteínas y carbohidratos, durante la embriogénesis, revierten completamente este proceso y comienzan una hidrólisis muy rápida de éstos mismos materiales en la germinación (Dure, 1975). En los embriones cigóticos, este proceso no es acompañado de la división celular de éstos tejidos, y por lo tanto, la reversión metabólica se da en una misma población celular. El número celular final del embrión, es alcanzado al inicio de la ontogenia y el posterior incremento en masa, puede ser resultado de la expansión celular y de la deposición de almidón y de proteínas de reserva (Dure, 1975).

La embriogénesis en los tejidos callosos, se inicia con la diferenciación de células somáticas que difieren de las células parenquimatosas vacuoladas que las rodean, por su denso contenido plasmático, su acumulación de almidón y que pueden estar cubiertas por una gruesa pared celular. De tales células se originan otras más pequeñas y con citoplasma muy denso. Estas se denominan proembriones y pueden desarrollarse cada una en un embrión globular o en una estructura muy similar que puede desarrollar las diferentes fases embrionarias y una plántula. Numerosos embriones, los cuales se desarrollan de células somáticas superficiales, son producidos si se disminuyen o eliminan las auxinas del medio. Se pueden distinguir 2 eventos fundamentales en el desarrollo temprano de los embriones somáticos:

- 1) La inducción de las células con competencia embriogénica.
- 2) La liberación del estado embriogénico inducido a su total desarrollo. (Kohlenbach, 1978).

Hasta ahora, la identificación de los ES ha sido fundamentalmente basada en observaciones morfológicas; equiparándola con una secuencia de desarrollo que es muy parecida a la encontrada en los embriones sexuales y que progresa del estadio globular, al corazón, al torpedo y finalmente al cotiledonar. Esta correlación se observa en estudios de microscopía óptica y microscopía electrónica, y se encuentra altamente conservada entre todas las plantas dicotiledóneas. (Dos Santos, et al. 1983).

En estudios de embriogénesis somática, realizados con algodón (*Gossypium hirsutum*), el primer estadio reconocible es el de globular, y consiste de masas de tejido, de superficie lisa, casi isodiamétricas, que emergen de un tejido calloso muy friable y organizado irregularmente. Los embriones somáticos, durante su subsecuente alargamiento, muestran un suspensor bien definido y una indentación apical, este estadio es denominado de corazón. La indentación apical representa la iniciación del desarrollo de los cotiledones, los cuales en el siguiente estadio -de torpedo-, desarrollarán cotiledones verdes bien definidos. La maduración de los ES involucra la elongación del eje embrionario sin un posterior crecimiento cotiledonar (Shoemaker et al. 1987). (Fig. 2).

En la ES, pueden encontrarse otros dos estados morfogenéticos: el estado de callo organizado y el inicio del estado corazón.

El primero ocurre con la transformación del callo a embriones globulares e involucra un periodo de rápida división celular que produce densas agrupaciones sin una epidermis aparente.

El segundo estado morfológico observado en cultivo, involucra la formación de una hendidura en el embrión globular para formar los cotiledones. La circunferencia de la hendidura debe desarrollar dos puntos donde el crecimiento este restringido. El meristemo apical esta presumiblemente localizado en el área inferior de la hendidura (Sung, 1985).

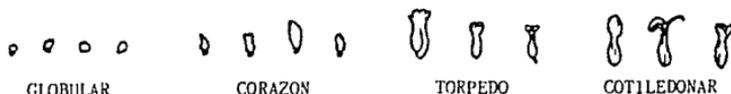


Fig. 2.- Estadios de desarrollo embrionario en la alfalfa (Tomado de Stuart, et al., 1985).

### III.11 SISTEMAS MODELO DEL DESARROLLO EMBRIONARIO in vitro

En la actualidad, se conoce mucho acerca de las condiciones de cultivo necesarias para la ES en algunas especies y en algunos sistemas establecidos como modelo (Daucus carota), la ES puede ser inducida y observada en algunas condiciones definidas, con un buen nivel de sincronía y con altos niveles de rendimiento y respuesta.

A pesar de estas posibilidades se conoce muy poco acerca de los eventos moleculares y bioquímicos involucrados en éste proceso (que tienen un alto valor teórico y práctico). También, es necesario proveer de alternativas para el tratamiento de especies que son recalcitrantes a la aplicación de las técnicas in vitro; para el rescate de poblaciones; en la mejora de la calidad nutricional de la semilla; para el entendimiento del desarrollo embrionario in vitro, y de la movilización de reservas, etc.

Por todo lo anterior, para usar un sistema de embriogénesis somática como modelo y estudiar los eventos bioquímicos tempranos del desarrollo, es necesario establecer hasta que grado hay real similitud entre los dos procesos; si pueden utilizarse marcadores bioquímicos para optimizar las condiciones de cultivo y si algunos factores químicos aplicados exógenamente al medio de cultivo, pueden influir en la regulación de la expresión y acumulación del material de reserva.

Las ventajas que presenta la ES de la alfalfa son:

- Como un modelo potencialmente útil para el estudio de los cambios que ocurren a nivel bioquímico durante la embriogénesis sexual.
- Para el estudio y control del proceso in vitro.
- Condiciones ambientales controlables.
- Sistema en el que se pueden alterar diferentes vías metabólicas por manipulaciones en el medio.
- Los embriones pueden ser removidos y están disponibles en grandes cantidades para estudios bioquímicos detallados.
- El proceso embriogénico ocurre en un corto periodo y ofrece una gran facilidad de manipulación y escalamiento.
- Puede ser parcialmente sincronizado empleando agentes exógenos; para tener poblaciones de células en un mismo estado de desarrollo.
- Posibilidad de inducir latencia en los ES (Ammirato, 1987.).

Estas ventajas, son importantes en los estudios de acumulación de reservas energéticas a utilizar en el proceso de conversión y la producción de semilla clonal a través de la encapsulación de ES (Redenbaugh, *et al.*, 1984.), con la opción de optimizar el proceso, hacerlo altamente mecanizado y de bajo costo.

Un criterio de la calidad de los ES, puede ser la expresión de las proteínas de reserva específicas de la semilla y que son comunes en las leguminosas: (7S y 11S) (Stuart, 1985).

### III.12 PROBLEMAS EN EMBRIOGENESIS SOMATICA

Por otro lado, la ES presenta algunas desventajas, las cuales se han observado y tratado de resolver en algunos sistemas de embriogénesis *in vitro*. Uno de los investigadores que han señalado estas desventajas de manera clara es Ammirato, quien en 1987, enfatizó algunos de los principales problemas en ES tales como:

1) El proceso embriogénico es repetitivo, el embrión puede ser centro de embriogénesis y desarrollar embriones secundarios en la base de la radícula, esto es también causa de asincronía en las diferentes fases del desarrollo.

2) Pueden existir embriones dobles, triples o en grupos, que al germinar generan brotes múltiples.

3) El desarrollo de los cotiledones puede ser anormal, poseer uno, dos o más en un solo eje embrionario, su desarrollo puede ser pobre o incluso estar fusionados o incompletos.

4) El embrión cuyo desarrollo fue normal, puede no germinar o hacerlo parcialmente con aparición solo de brotes o raíces.

5) Algunas etapas del desarrollo embrionario, pueden ser muy rápidas, lentas o no presentarse.

6) Al final del desarrollo no se presenta ningún tipo de latencia, como el que experimentan embriones de origen sexual.

7) Finalmente no se han encontrado las condiciones para que los ES acumulen sustancias de reserva utilizables durante la germinación.

### III.13. PROTEINAS DE RESERVA EN SEMILLAS

El estudio de la biosíntesis de las proteínas de reserva (PR) de las semillas, es atractivo, no solo desde el punto de vista de la importancia de estas proteínas como una de las principales fuentes de nutrimentos para el hombre y los animales, sino también porque representan un interesante modelo de la expresión genética vegetal. Estas PR proveen al hombre directamente con más de 2/3 de la dieta proteica (55 % atribuido a los cereales y 15 % a las leguminosas). (Pernollet, 1985).

Desde 1969, Nitsch, propuso que el estudio de los aspectos bioquímicos del desarrollo de embriones cigóticos en angiospermas, podía ser modelado usando sistemas *in vitro*. Con este fin se han propuesto como marcadores bioquímicos para el diagnóstico de la calidad de los embriones somáticos (ES) en diferentes estadios de desarrollo a las proteínas de reserva (PR), principalmente a dos de ellas denominadas 11S (leguminas) y 7S (vicilinas), de acuerdo a su coeficiente de sedimentación; estas PR son tejido-específicas y muy abundantes, su síntesis es incrementada durante el desarrollo (Sung, 1985), además de que sus patrones de expresión temporal pueden ser estudiados durante este periodo.

Estas PR de las semillas se acumulan en altos niveles (aprox. 30 %), pues actúan como reserva alimenticia para el embrión en desarrollo de semillas sin endospermo tales como Brassica o Medicago. Así, podría esperarse que el incremento en el nivel de deposición de las PR representara un incremento concomitante en el vigor de los embriones somáticos durante la germinación. (Stuart *et al.*, 1988.). Las PR son reguladas durante el desarrollo lo que las hace muy útiles ya que la medida de los niveles de síntesis de las PR pueden ayudar a determinar como los nutrimentos, hormonas y otros parámetros, controlan el desarrollo embrionario *in vitro*.

El nivel de acumulación de las PR en los ES es importante para estudios comparativos de embriones sexuales y somáticos, cuyo objetivo es saber si los embriones de ambos sistemas son bioquímicamente similares o sólo morfológicamente parecidos. Además son expresadas en los ES (Stuart, *et al.*, 1985).

Las proteínas de reserva han sido estudiadas por algunos investigadores (Derbyshire *et al.*, 1976; Mosse and Landry, 1980; Larkins, 1981; Pernollet and Mosse, 1983; Thompson *et al.*, 1989; Perez and Goldberg, 1989; DeLisle and Crouch, 1989.), quienes han destacado algunas de sus características más importantes para el estudio del control de la expresión genética en el desarrollo vegetal:

- a) Su importante función de proveer de aminoácidos y nitrógeno a la plántula durante la germinación para soportar esta primera fase heterotrófica de su desarrollo
- b) No tienen otra función conocida más que la de reserva.
- c) Contribuyen con aprox. el 80 % de los compuestos nitrogenados de la semilla.
- d) Su peculiar composición aminoacídica.
- e) Su localización dentro de organelos de reserva específicos (cuerpos proteicos), durante el desarrollo de la semilla.
- f) Su distribución natural en dos grupos principales (leguminas y vicilinas en leguminosas y prolaminas y glutelinas en cereales), las proporciones relativas de las cuales difieren marcadamente de unas especies a otras y en algunas más son dependientes del genotipo.
- g) Son estables durante el período de latencia que separa la embriogénesis de la germinación.
- h) Son específicamente degradadas durante la germinación y el crecimiento de la plántula para proveer a ésta de una fuente de carbono y nitrógeno.

Se sabe que las PR consisten de series polimórficas de moléculas las cuales son codificadas por familias de multigenes (Marks and Larkins, 1982; Pedersen et al., 1982; Lycett et al., 1983; Pernollet and Mosse, 1983a; Thompson et al., 1989; Perez and Goldberg, 1989). La comparación de las estructuras primaria y secundaria de estas proteínas, ha mostrado patrones muy conservados desde un punto de vista filogenético (Pernollet and Mosse, 1983), que se han atribuido a necesidades estructurales y funcionales muy específicas.

Las principales proteínas de las leguminosas son almacenadas en los cotiledones del embrión diploide. Estas proteínas llamadas globulinas son solubles en soluciones salinas y son principalmente divididas en los grupos de leguminas y vicilinas. Las primeras tienen precursores de 60 Kd constituidos de una subunidad-acídica (40 kD) y una subunidad básica (Chrispeels 1981). Las vicilinas no sólo se originan de la hidrólisis de un precursor común más grande, sino que su extremo carboxilo terminal es hidrolizado. A diferencia de las leguminas, las vicilinas son glucoproteínas y consecuentemente son glucosiladas post-traduccionalmente en el retículo endoplásmico (Davies and Delmer, 1979, 1981; Chrispeels 1981). La glicosilación en sí misma no es un paso esencial en la síntesis de los polipéptidos de vicilina ni en su ensamblaje en polímeros (Badenoch-Jones et al., 1981). Además se ha mostrado que este ensamblaje ocurre tan pronto

como los monómeros son sintetizados, evitando el rompimiento de la cadena polipeptídica. (Pernollet, 1985).

En 1982, Crouch comparó la acumulación de las proteínas de reserva durante el desarrollo de embriones cigóticos in vivo e in vitro de Brassica napus L. Encontrando que dos proteínas principales de reserva son sintetizadas durante este proceso y que aparecían a diferentes tiempos y en mucho menor cantidad (10%), en los embriones cultivados in vitro que en aquellos cultivados in vivo.

Otro de los sistemas en los que se ha estudiado el patrón de acumulación de las proteínas de reserva, es el de algodón (Gossypium hirsutum L.), en este sistema, el primer estadio de desarrollo en que se detectó la proteína madura, fue el de globular, en una concentración total de 0.35 % de la masa proteica total del embrión. En los estadios torpedo y cotiledonar, se encontraron 3.0 % y 1.3 %, respectivamente. En tanto que en el embrión sexual va de 16 a 24 % (Dure y Chlan, 1981). Estos índices tan bajos, pueden ser explicados porque la elongación del eje embrionario no es acompañado en el estadio cotiledonar por un correspondiente incremento en el tamaño de los cotiledones. Se encontró también que la máxima síntesis de proteínas de reserva, ocurre en los estadios de globular y corazón, así como la síntesis y acumulación de precursores de estas proteínas (Shoemaker, 1987).

El patrón de síntesis, procesamiento y acumulación de las proteínas de reserva, emula al patrón que ha sido reportado para la embriogénesis cigótica, sin embargo, los embriones somáticos, acumulan menos proteínas y en estadios de desarrollo más tempranos. (Shoemaker et al., 1987).

La acumulación de proteínas ha sido estudiada en algunas especies por Dure (1975), Millerd (1975), Chrispeels (1981) y Boulter (1981). Se ha establecido que la embriogénesis es remarcadamente constante de una especie de leguminosa a otra. La deposición de PR es concomitante con la biosíntesis de los otros productos de reserva durante la fase de expansión celular del crecimiento embrionario, el cual sigue a la fase de rápida división celular en la que esencialmente no se sintetizan PR. En general, la aparición de las PR tiene lugar en el noveno y decimosegundo día después de la floración y la síntesis máxima esta comprendida entre el decimoquinto y decimotercer día. Sin embargo, esto es variable dependiendo de las especies, cultivares y condiciones del crecimiento (Pernollet, 1985).

Otro aspecto importante de la biosíntesis de las proteínas de la semilla es que sirvan como un modelo para el estudio de la expresión de los genes de las plantas: el embrión de las leguminosas al igual que el endospermo de los cereales, son ejemplos de sistemas celulares eucarióticos

diferenciados, en los cuales un número relativamente pequeño de proteínas son sintetizadas en exceso sobre otras proteínas y dado que son el resultado de la expresión de genes localizados en loci diferentes de distintos cromosomas, permiten el estudio de la regulación de la expresión de familias multigénicas. (Pernollet, 1985).

Durante el desarrollo de la semilla hay un incremento sustancial en la acumulación de material de reserva. Puede haber un período de latencia, pero si las condiciones son favorables, la germinación puede ocurrir y el material de reserva es usado como una fuente de nitrógeno y carbono para la plántula en desarrollo. El nitrógeno se encuentra principalmente en las proteínas y el carbono en la forma de almidón o aceite.

Las proteínas de reserva, junto con los carbohidratos, son sintetizadas durante la formación de la semilla. Después de la germinación, son hidrolizados y ayudan a soportar los altos niveles de síntesis proteica de la plántula en crecimiento.

Generalmente la tasa de depositación de proteínas, incrementa dramáticamente después del primer tercio del período de desarrollo (Derbyshire *et al.*, 1976).

Las características más importantes de estas proteínas para el establecimiento del sistema de alfalfa como modelos son las siguientes:

- Son tejido específicas.
- Están presentes en grandes cantidades (30 %).
- Su síntesis es por un corto período.
- Su estudio ofrece importantes aplicaciones potenciales.
- No tienen una vía biosintética larga.
- Poco número de genes involucrados.
- Secuencia altamente conservada en las leguminosas.
- Técnicas analíticas sensibles y disponibles.

### III.13.1. FORMACION DE LOS CUERPOS PROTEICOS.

Las PR se acumulan en organelos subcelulares llamados cuerpos proteicos. Estos son organelos esféricos rodeados de membranas, tienen unas pocas micras de diámetro, contienen a las PR (contenido promedio: 80%) y fitatos. En las leguminosas estos organelos pueden ser observados aun en las semillas maduras.

Mosse and Pernollet (1983), han planteado un proceso hipotético que describe la formación de cuerpos proteicos en cotiledones de leguminosas. Por un lado, la 7S una vez que es sintetizada sobre el retículo endoplásmico rugoso, sería

transportada vía el aparato de Golgi hacia vacuolas cuya última división serán los cuerpos proteicos.

La formación de los cuerpos proteicos involucra el transporte a través de la membrana del RE hacia el lumen. Esto implica que las PR son sintetizadas por polisomas unidos a la membrana del RE y que deben ser consideradas como proteínas secretadas.

### III.14 ORGANIZACION Y EXPRESION DE LOS GENES DE LAS PROTEINAS DE RESERVA.

#### Factores que controlan la síntesis de PR en la semilla.

El conocimiento de la proteosíntesis a nivel molecular, sigue siendo insuficiente para explicar todas las regulaciones observables a nivel macroscópico, las cuales modifican la síntesis de las PR de las semillas. Es por ésta razón, que es importante conocer la influencia de la nutrición de la semilla para entender algunos de los factores que controlan la síntesis de PR en semillas.

**Nutrición de la semilla:** Mientras que los procesos elementales de la asimilación del carbono, síntesis de sacarosa, carga y descarga del floema, han sido bien descritos, hay poca información disponible en cuanto a la proteosíntesis en la semilla durante el llenado del grano bajo condiciones de campo (Pernollet, 1985).

Así, la biosíntesis y acumulación de las PR son determinadas por algunas características comunes y algunas particularidades de diferentes especies. Hasta donde se sabe, los sistemas proteosintéticos de acumulación de diferentes plantas tienen en común las siguientes características:

a) Son sistemas altamente productivos y eficientes, no obstante funcionan mediante diferentes mecanismos.

b) Las PR, secretadas dentro de cuerpos proteicos, siguen modificaciones post y co-traduccionales (remoción de péptidos señal).

c) El control de su síntesis ocurre a nivel transcripcional.

d) La biosíntesis de las cadenas polipeptídicas es sincrónica para un grupo de proteínas, excepto en los casos de condiciones de estrés poco frecuentes.

e) La vida de los mRNA's es larga.

f) Las alteraciones fenotípicas o genotípicas de la proteosíntesis, involucran un control regulatorio de la transcripción.

De cualquier modo, el conocimiento de la regulación de la proteosíntesis y de los genes regulatorios contribuirá al mejoramiento de cultivos, cualquiera que sea la metodología finalmente usada, esto es, parámetros fisiológicos, bioquímicos, genéticos o de biología molecular. (Pernollet, 1985).

Se ha reportado por Perez y Goldberg en 1989, que los genes de las PR de semillas son altamente regulados con respecto al tipo celular en embriones cigóticos y somáticos. Estos autores observaron que los genes de las células del embrión expresan proteínas específicas de las semillas durante las primeras etapas de la embriogénesis y que los patrones de localización de los mRNA de la semilla son conservados entre especies de plantas distantemente relacionadas. Además de que éstos patrones pueden presentarse aún en la ausencia de tejido seminal no embriogénico que rodee al embrión.

### III.15. TECNICAS ANALITICAS PARA EL ESTUDIO DE LAS PROTEINAS DE RESERVA

Debido a que las proteínas de reserva consisten de muchas subunidades es posible que muchas formas de la misma proteína puedan ocurrir en un mismo individuo o en una población de individuos (Derbyshire *et al.*, 1976). La similitud de la proteína 11S en diferentes plantas, podría ser debida ya sea a una evolución convergente en respuesta a una necesidad funcional común o a un ancestro común. (Derbyshire *et al.*, 1976). Lo que nos permite considerar que el conocimiento de el metabolismo de las proteínas en una especie, es válido para otras que presentan similitud en la composición polipeptídica de sus proteínas, como es el caso de algunas especies de la familia Leguminosae.

Las necesidades funcionales más importantes y que pueden ser analizadas son:

- a) Ser sintetizada en y pasar a través del retículo endoplásmico rugoso.
- b) Actuar como un almacén adecuado de nitrógeno, esto es, tener una composición amimocídica, la cual mediante hidrólisis, provea de todos los compuestos nitrogenados a la plántula, usando la maquinaria enzimática de la misma.

Algunas de las características fisicoquímicas que les confieren ciertas capacidades funcionales a éstas proteínas de reserva, pueden ser estudiadas empleando algunas técnicas analíticas específicas como se señala en la sig. tabla.

CARACTERISTICA	METODO DE ANALISIS
Tamaño molecular	Ultracentrifugación
Punto isoeléctrico	Isoelectroenfoque
Composición y peso molecular de las subunidades	SDS-PAGE

Estas características ya han sido determinadas para algunas especies, una posterior caracterización de las globulinas, involucra la determinación de su composición química (por ejemplo, composición aminoacídica, contenido de carbohidratos, etc) y la separación, purificación y caracterización de sus subunidades constituyentes.

En el caso de las proteínas vegetales, hay algunos problemas para su análisis debido a que éstas proteínas son muy grandes y complejas, por lo que no es fácil aislarlas, purificarlas y analizarlas, sobre todo en el caso de las globulinas, las cuales se encuentran solubilizadas en un medio salino.

La agregación de las moléculas de proteína la cual ocurre durante la precipitación isoeléctrica lograda por diálisis o cromatografía, puede por sí misma incrementar las interacciones proteína-proteína a pesar de la presencia de sal, por lo que se ha recurrido a la presencia de algunos agentes disociantes en el amortiguador de extracción.

La disociación de la globulinas puede lograrse por alteración en el pH y por exposición a agentes disociantes, por ejemplo: urea, formamida, clorhidrato de guanidina, detergentes,  $\beta$ -mercaptoetanol y ditiotreitól. Estos últimos dos reactivos, son usados para romper los puentes disulfuro y los otros rompen los puentes de hidrógeno.

El ditiotreitól (al igual que el  $\beta$ -mercaptoetanol), inhibe la formación de puentes disulfuro entre proteínas con grupos sulfhidrilo libres y por esta razón reducen la polimerización y subsecuente insolubilidad, por lo que adicionado a los amortiguadores de extracción, ayuda a incrementar la cantidad de proteína extraída.

El EDTA es un agente neutro quelante muy útil en la purificación de enzimas y que también incrementa los rendimientos de extracción de proteínas de semillas, ya que inhibe la actividad de algunas proteasas al quelar sus cofactores.

Los inhibidores de proteasas tales como el fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) son efectivos para minimizar la proteólisis.

El método más exitoso para la purificación de la 11S ha sido la precipitación isoelectrónica, dejando a la 7S en suspensión. (Derbyshire *et al.*, 1976).

Las características útiles para el análisis de las proteínas de reserva de la alfalfa son:

CARACTERISTICA	7S	11S
Solubilidad	En bajas concentraciones de sal, y a temperaturas bajas en amortiguadores pH 7.0	En altas concentraciones de sal en amortiguadores pH 7.0.
Peso molecular	Entre 180 y 220 kD	aprox. 360 kD
Subunidades		Acidas o básicas con PM entre 27 y 37 kD y entre 20 y 24 kD, respectivamente.
Agregación Poliipeptídica	68 kD (tripleto), 52, 36 y 32 kD.	47 kD (tripleto), 39, 22 y 20 kD
Distribución general de sub- unidades carac- terísticas*	I 23 kD II 43 kD III 47-50 kD IV 45-56 kD V 53-56 kD	

\* (Derbyshire, 1976)

La proteína con un valor de sedimentación de 7S esta compuesta de una serie de bandas alrededor de 69 kD, y bandas simples en 52, 36, 32 y 20 kD. La proteína que sedimenta en 11S es compuesta de un tripleto en 47 kD, un doblete en 39 kD y bandas simples en 22 y 20 kD. (Stuart, 1985).

Existe además la posibilidad, de que el desarrollo de algunas técnicas serológicas para la detección de las proteínas 11 S y 7 S de la alfalfa, puedan ayudar en la valoración de la calidad de los embriones somáticos individuales. El establecimiento de tales ensayos, puede ayudar en la identificación y optimización de los procedimientos que mejoraran el vigor de los embriones somáticos. (Stuart, 1985).

La inmunolectroforesis puede emplearse para identificar y cuantificar globulinas, es un excelente método para separar mezclas de 11S y 7S. (Derbyshire *et al.*, 1976).

En 1981, Crouch y Sussex, demostraron que usando anticuerpos dirigidos contra las proteínas de reserva de embriones sexuales, éstas eran detectadas sólo en los ejes y cotiledones y primeramente en los estadios cotiledonares tempranos y que se acumulan en una tasa promedio de 26 µg/embrión/día, durante el tiempo de máxima deposición. Utilizando la técnica de Rocket inmunolectroforesis.

El uso de tales técnicas puede mejorar nuestro entendimiento de la germinación precoz de los embriones somáticos.

Dado que para la inducción de la embriogénesis se requiere de la aplicación de auxinas, y para el desarrollo embrionario subsecuente, este parece ser dañino; se sugiere que el proceso necesario para la inducción de la embriogénesis es distinto del proceso de la maduración de los embriones somáticos (Stuart *et al.*, 1985).

Así factores tales como la aplicación del 2,4-D, pueden evitar la acumulación de las proteínas de reserva, la cual es característica de la fase de desarrollo de la embriogénesis sexual. La consideración de los procesos que controlan el desarrollo de los embriones somáticos dependerá de la disponibilidad de ensayos para la identificación de factores los cuales afectan el proceso de maduración. (Stuart, 1985).

### III.16. CARBOHIDRATOS

Los carbohidratos están presentes como materiales de reserva en algunas especies de la familia Leguminosae, principalmente en la forma de almidón y de galactomananos. Estos materiales son hidrolizados después de la imbibición, y proveen de monosacáridos importantes para la formación de paredes celulares y para rutas biosintéticas como la glucólisis (McClearnly and Matheson, 1976.). El almidón se almacena en gránulos, en tanto que los galactomananos se encuentran en las paredes celulares de tejidos como el del endospermo.

Brown y Huber en 1988, realizaron estudios sobre la movilización de reservas y la formación de almidón en soya. Confirmando que en la movilización de reservas, el almidón se acumula y después se degrada durante los primeros días del crecimiento de la plántula (Adams and Rinne, 1980. Brown y Huber 1988).

Anteriormente se consideraba que esta formación temporal de almidón era resultado de un exceso de carbono por la movilización de algunos de los lípidos presentes en la semilla (Adams and Rinne 1980), o de otras reservas (Halmer 1985). Sin embargo se ha observado, que durante el crecimiento inicial de la plántula, (Glicine max L.), la formación de almidón aparentemente puede ser relacionada cuantitativamente a la disminución de azúcar soluble (principalmente sacarosa), y no de otras reservas. Debido a que en este momento, la movilización de reservas de lípidos y proteínas, no se ha iniciado, la formación de almidón parece ser a expensas de la única fuente de carbono disponible: los azúcares solubles. De éste modo, la formación de almidón podría tener un efecto adverso sobre el crecimiento del eje embrionario, ya que ambos procesos podrían competir por suministros limitados de carbono (Brown y Huber, 1988).

En estos estudios también pudo observarse que la acumulación de almidón ocurre durante la fase heterotrófica del crecimiento de la plántula. Sintetizado a partir de azúcares solubles. Y también se pudo determinar que la luz no es un requerimiento para la formación de almidón.

La actividad de la enzima hidrolítica específica del almidón la alfa-amilasa, puede ser un buen indicador de la actividad hidrolítica en el embrión, sobre todo al final del desarrollo de los embriones somáticos, ya que se ha demostrado que los niveles de alfa-amilasa, se incrementan durante la germinación. (Ilan y Gepstein. 1981).

### III.17. AGENTES INDUCTORES DE EXPRESION Y/O ACUMULACION DE MATERIALES DE RESERVA EN SISTEMAS in vitro

Es sabido que si se retira el embrión inmaduro de una semilla, y se cultiva en un medio nutritivo o agua, detendrá su desarrollo normal y germinará precozmente. Deteniéndose también la síntesis de proteínas y otros metabolitos (Eisenberg y Mascarenhas, 1985).

La causa de éste fenómeno puede ser atribuida al cambio en las condiciones ambientales a las que son sometidos los embriones inmaduros. En cultivos in vitro, éstos embriones cigóticos son limitados en su desarrollo porque su entorno natural es eliminado, esto implica que no cuentan con protección física ni con el suministro completo y adecuado de todos los factores que requieren para su desarrollo y que le son provistos por su entorno natural. En un caso similar se encuentran los ES, los cuales están formados por el eje embrionario y los cotiledones, pero no hay ninguna cubierta seminal que los proteja, éstos embriones también germinan precozmente, los ES no acumulan material de reserva y

dependen del medio nutritivo para su sobrevivencia y desarrollo.

Algunos autores (Sussex and Crouch, 1980. Crouch y Sussex, 1981, y Quatrano et al., 1983), han propuesto la utilización de algunos agentes químicos que puedan ser adicionados exógenamente a los cultivos in vitro y que de alguna manera impidan la germinación precoz.

La idea es entonces, tratar de emular las condiciones ambientales naturales de los embriones cigóticos, estimulando la inhibición de la germinación precoz directamente con inhibidores de crecimiento o provocando la desecación gradual del embrión, permitiendo además que la síntesis y acumulación del material de reserva, continúe. Dos de los agentes químicos más utilizados para provocar este efecto son el ABA y el sorbitol. Un tercer agente que no ha sido reportado con anterioridad en la literatura, es el extracto de embriones sexuales inmaduros de alfalfa (EEC), el cual puede ser útil para el suministro de factores importantes en el desarrollo de los ES en cultivo, que no pudieran ser obtenidos por otro medio. La utilización de este último agente nos lleva a una situación un tanto insegura pero válida, ya que se trabaja con un medio de cultivo químicamente indefinido y que puede presentar problemas de reproducibilidad, sin embargo, es importante considerar que éste es uno de los primeros trabajos realizados con este enfoque y que los resultados que se pueden obtener son de mucho interés.

### III.17.1 ACIDO ABSCISICO:

El ABA es un pequeño ácido monocarboxílico (Mr 264.3, pK 4.8) que se disocia en diferente grado en los distintos compartimentos celulares. La forma protonada permea libremente a través de las membranas, donde el anión disociado es impermeable. Consecuentemente, la distribución entre los diferentes compartimentos es determinada por la diferencia en pH entre los mismos encontrándose que entre mayor sea la diferencia, mayor será la cantidad de ABA que se acumule en un compartimento alcalino (Blair et al., 1988).

Se ha demostrado que el ABA induce cambios en la permeabilidad para aniones y agua en las células guarda y afecta en la conducción de iones y agua en las raíces. (Blair et al., 1988). Además ha sido referido por algunos autores, que incrementa la síntesis y acumulación de proteínas de reserva e inhibe la germinación precoz en los embriones cultivados in vitro (Sussex et al. 1980, Crouch y Sussex, 1981, y Quatrano et al. 1983). Pues al ser aplicado éste al medio de cultivo, los embriones no germinan.

Durante la embriogénesis, el contenido de ABA de los embriones incrementa con el peso fresco de la semilla y

decrece durante la fase de maduración. El ABA puede también estar involucrado en la acumulación en el almidón.

En 1985 Bray y Beachy, estudiaron la regulación de la expresión genética específica por aplicación exógena de ABA durante el cultivo *in vitro* de cotiledones inmaduros de soja (*Glycine max* L. merr. cv Provar). Encontrando que la adición de ABA, producía un incremento en la concentración de sacarosa en el medio de cultivo, se causaba un incremento en la concentración de ABA y el mismo efecto en la subunidad B de la 7S.

El mismo efecto se ha logrado con otros agentes, como sorbitol o flurifona, lo que puede indicar que puede haber otros factores además del ABA que regulen la síntesis de proteínas embrio-específicas, o que no es el efector único.

Según Eisenberg y Mascarenhas en 1985, la aplicación exógena de ABA, evita la germinación precoz en todos los estadios de desarrollo. Las concentraciones menores de  $10^{-5}$  M (concentración óptima), son parcialmente efectivas. El crecimiento (incremento en peso fresco), de embriones en un estadio de desarrollo intermedio, fue dependiente de ABA y tales embriones requieren de ABA para continuar la síntesis de proteínas de reserva durante el cultivo.

Por otro lado se ha visto que la respuesta de las diferentes especies a este agente, depende también del estado de desarrollo en que se encuentren, los embriones jóvenes no germinarán precozmente, pero los que se encuentren en un estadio de desarrollo más avanzado si lo harán en presencia de ABA (Eisenberg and Mascarenhas, 1985).

Una hipótesis de Morris, *et al.* 1988 es que es razonable suponer que tanto la concentración de ABA endógena, como el estado hídrico del tejido materno, actúan en la regulación de la movilización de agua del embrión y por esta razón, controlan la germinación precoz *in vivo*. Los niveles cambiantes de ABA durante el desarrollo del embrión, reflejan cambios en el estado hídrico del tejido materno y el grado de inhibición requerido por el embrión para evitar la germinación precoz. Esto postula una retroalimentación entre la presión de turgencia del embrión y la síntesis de ABA (Pierce y Raschke, 1980). El ABA inducido podría disminuir la extensibilidad de la pared celular y evitar la expansión celular. La expresión continuada de aquellos genes requeridos para el desarrollo del embrión deben ser regulados por una retroalimentación similar basada en la inhibición de la expansión celular.

La diferencia en los niveles de ABA de los embriones en cultivo puede ser debida a que los niveles de ABA del inóculo sean altos o bajos y por esto puede ser necesario incrementarlos o no.

Recientemente se ha venido trabajando con la hipótesis de que la inhibición de la germinación y el mantenimiento e incremento de la síntesis de proteínas de reserva puede estar desacoplada de los altos niveles de ABA, sugiriendo que el ABA probablemente no es el efector primario regulador de este proceso (Zeevart and Creelman, 1988; Finkelstein and Crouch, 1986).

### III.17.2 SORBITOL:

Como ya se mencionó, la desecación es una parte importante del proceso de maduración, ya que mientras los embriones germinan precozmente, se observa una mezcla de proceso embrionicos y germinativos, el secado prematuro y la subsecuente rehidratación de los embriones inmaduros de trigo y frijol por ejemplo, resulta en un cambio en el desarrollo potencial de crecimiento germinativo y embrionario (Finkelstein y Crouch, 1986).

El estrés hídrico, puede ser emulado en cultivo, utilizando sacarosa, las altas concentraciones de éstos osmóticos, pueden inhibir la germinación y estimular la síntesis de proteínas de reserva embrio-especificas en embriones en estadios cotiledonar joven, cuando están empezando apenas a acumular reservas, emulando efectivamente el entorno del embrión sexual, se ha demostrado que este fenómeno es mejor emulado por las altas concentraciones de osmótico y más rápidamente que por el ABA (Finkelstein, R. R. and Crouch, M. L., 1986). Sugiriendo que el bajo contenido de agua es probablemente el factor más importante en regular la transición a la latencia en las etapas finales del desarrollo embrionario.

En relación a los 3 agentes osmóticos utilizados para estos estudios, se ha visto que probablemente producen un efecto osmótico no nutricional. Los tres evitan la germinación bloqueando la movilización del agua, pero aún no esta claro como es que esto afecta a la expresión genética.

Sin embargo, se ha sugerido que el ABA y los osmóticos pueden actuar de manera conjunta ya que el estrés osmótico resulta en la liberación en el medio de una gran cantidad de ABA. Durante la deshidratación, la pérdida continua de agua, causa una contracción de las paredes celulares y el plasmalema se mantiene sostenido contra la pared. Esta situación (citorrhis), es similar a la encontrada en un tejido tratado con un osmótico que no penetre las paredes celulares. Cuando el turgor es cero, el relajamiento del plasmalema y los cambios conformacionales asociados pueden ser la señal para la síntesis de ABA (Zeevart and Creelman, 1988).

### III.17.3 EXTRACTO DE EMBRIONES SEXUALES INMADUROS DE ALFALFA (EEC).

Este extracto, no ha sido empleado con anterioridad por otros investigadores, sin embargo es muy posible que contenga algunos de los factores necesarios para regular el desarrollo embrionario in vitro de manera similar a como lo regula in vivo.

La utilización de éste extracto es arriesgado ya que debido a que nos lleva a tener medios de cultivo químicamente indefinidos, el control que podemos tener sobre el desarrollo embrionario es incompleto. Sin embargo, puede ser de utilidad saber si es capaz o no de favorecer o producir la respuesta deseada.

Una vez que se tenga conocimiento de si las respuestas posibles a obtener con éste agente son favorables, sería interesante tratar de aislar poco a poco el factor que las provoca.

Este enfoque de alguna manera, justifica la utilización del extracto, ya que nos puede llevar al aislamiento de algún factor o algunos compuestos importantes en la regulación de la expresión genética de los embriones somáticos, que sería muy útil para entender como ocurre la regulación del desarrollo embrionario en los embriones sexuales in vivo.

#### IV. MATERIALES Y METODOS

Como ya se ha mencionado, en la alfalfa se han logrado establecer sistemas confiables de micropropagación, vía embriogénesis somática empleando el peciolo como explante. Sus ES facilitan el cultivo por su tamaño (2 a 5 mm) y pueden ser obtenidos en relativamente poco tiempo (5 a 7 semanas). En la actualidad se cuenta ya con bastantes antecedentes de su comportamiento in vitro (Brown and Atanassov, 1985; Dos Santos et al., 1983; Meijer and Brown, 1987; McCoy and Walker, 1984; Johnson 1981; Novak y Koněcna, 1982; Stuart et al., 1985).

##### IV.1 MATERIAL VEGETATIVO:

En este estudio se trabajó con semillas de alfalfa (Medicago sativa L.), variedad Reagenlander y plantas de la línea A7034, proporcionadas por el Plant Research Center of Agriculture de Canadá y cultivadas en la Cd. de México en condiciones de invernadero desde 1987.

Para la obtención de los inóculos, se seccionaron peciolos de las plantas de alfalfa A7034 mencionadas, los cuales fueron deshojados y mantenidos sumergidos en agua para evitar su desecación y posteriormente desinfectados superficialmente dentro de la campana de flujo laminar.

##### IV.2 CULTIVO in vitro:

###### IV.2.1. Medios empleados:

Los medios de cultivo basales que se emplearon fueron: MS (Murashige y Skoog, 1962), MS modificado (Meijer y Brown, 1987) y B5e (Villegas y Brown, 1987, modificado de Gamborg et al., 1968). La composición de estos medios se muestra en el Apéndice II.

Los medios mencionados fueron esterilizados por autoclave a 15-17 lbs/pulg<sup>2</sup> de presión y 121°C de temperatura durante 20 minutos y después de gelificar a temperatura ambiente eran mantenidos en refrigeración por un periodo máximo de 3 meses.

###### IV.2.2. Desinfección del material vegetativo:

El tejido se sumergió en una sol. acuosa de etanol al 70 % durante 30 segundos y posteriormente en una solución de hipoclorito de sodio en agua con una concentración final teórica de 1.2 % de cloro activo (ver preparación de la solución en el apéndice I), durante 8 minutos, transcurrido este tiempo, se eliminó el cloro con 4 ó 5 porciones de 125

ml de agua destilada estéril; hasta que no hubiera olor perceptible a cloro. La desinfección se realizó dentro de una campana de flujo laminar.

#### **IV.2.3. Manejo del material vegetativo:**

El manejo del material vegetativo, fue realizado en condiciones asépticas dentro de una campana de flujo laminar marca VECO unidad GHFL A12 y se trabajó con material quirúrgico esterilizado por autoclave a 15-17 lbs/pulg<sup>2</sup> durante 60 minutos. Este material se mantuvo sumergido en un tubo de ensayo de 25 mm x 200 mm, con aprox. 30 ml de etanol al 70 % y se flameó en un mechero Bunsen cada vez que era sacado del tubo.

#### **IV.2.4. Inoculación:**

Los pecíolos desinfectados fueron transferidos a cajas de Petri estériles dentro de las cuales se vertía un poco de agua destilada estéril, en éstas cajas los pecíolos se seccionaron con bisturí y se manipularon con pinzas estériles. Los fragmentos (6-9 mm), se inocularon en frascos de vidrio de 50 x 30 mm o de 50 x 25 mm, con 8-10 ml de medio de cultivo y a una densidad de 7-9 explantes/frasco.

#### **IV.2.5. Condiciones de incubación:**

La incubación de los cultivos se llevó a cabo en condiciones de fotoperíodo luz-oscuridad de 16/8 horas a una temperatura de 25°C ± 5°C, la iluminación fue proporcionada por lámparas fluorescentes de 39 watts OSRAM (luz de día), colocadas a 30 cm de distancia de los frascos de cultivo.

#### **IV.2.6. Protocolo de cultivo in vitro:**

El protocolo de cultivo que se utilizó, está basado en trabajos anteriores realizados con embriones somáticos de alfalfa A7034 en los cuales se desarrolló un sistema que permite la separación de las dos fases (inducción y desarrollo), durante el desarrollo embrionario, utilizando dos diferentes medios de cultivo (Peña, 1988 y Fuentes, 1989).

##### **a) Inducción:**

Los pecíolos fueron sembrados en medio B5 suplementado con 1.0 mg/l de 2,4-D, 0.2 mg/l de cinetina, 30 g/l de sacarosa, 1.75 g/l de casaminoácidos y 9 g/l de Bacto agar y fueron cultivados durante 18 días en condiciones de fotoperíodo (16/8) y a 25°C de temperatura.

## b) Desarrollo:

A los 18 días de cultivo, los pecíolos con su respectiva formación de callo, se transfirieron en condiciones asépticas a medio B5 suplementado con 30 g/l de sacarosa, 1.75 g/l de casaminoácidos y 9 g/l de Bacto agar, los callos fueron disgregados parcialmente (para incrementar rendimiento) e inoculados en frascos de vidrio de 50 x 30 mm, con una densidad de 4-6 callos/frasco o en frascos Gerber a una densidad de 8-10 callos/frasco, en este medio fueron cultivados por 24 días en condiciones de fotoperíodo y temperatura estándar.

Durante este tiempo se evaluó la respuesta, rendimiento y crecimiento del cultivo, de acuerdo a las siguientes fórmulas:

$$\text{RESPUESTA} = \frac{\# \text{ de callos con embriones}}{\# \text{ callos totales.}} \quad \text{o} \quad \frac{\text{g. embriones}}{\# \text{ de callos}}$$

$$\text{RENDIMIENTO} = \frac{\# \text{ total de embriones}}{\# \text{ callos}} \quad \text{o} \quad \frac{\text{g. embriones}}{\text{g. callo}}$$

$$\text{CRECIMIENTO} = \frac{\text{g. callo c/embriones}}{\# \text{ callos}}$$

De todos los callos con embriones obtenidos al final del desarrollo, se tomó una parte control (aprox. 12 callos), para los ensayos de germinación; el resto de los callos fueron separados de los embriones somáticos y a éstos se les determinó el peso fresco y seco, después de lo cual se utilizaron para extracción, cuantificación y análisis electroforético de las proteínas de reserva.

### IV.2.7. Germinación de embriones somáticos (ES):

Transcurridas las 6 semanas totales de cultivo (42 días), fueron evaluadas la respuesta y rendimientos finales y los embriones somáticos se transfirieron a frascos Gerber o Magentas con medio MS al 50 % en sales, suplementado con 15 g/l de sacarosa y 8 g/l de Bacto agar. Se transfirieron de 15 a 20 ES/frasco. Los embriones elegidos para germinación, fueron aquéllos que presentaron la morfología característica del estadio cotiledonar o del torpedo maduro (con longitudes aproximadas de 2 a 4 mm). Los índices de germinación (%), se evaluaron a los 30 y 60 días después de transferir los embriones.

Las plantas generadas por estos embriones somáticos se mantuvieron in vitro o se transferían a tierra, siendo de cualquier modo reutilizadas para nuevas siembras in vitro; por lo que se siguió un proceso de selección recurrente.

#### IV.3. SEPARACION DE EMBRIONES SOMATICOS POR CENTRIFUGACION EN GRADIENTES DE DENSIDAD DISCONTINUA DE SACAROSA:

Dado que el desarrollo embrionario in vitro (e in vivo), es asincrónico, la población de embriones a un tiempo es heterogénea, lo cual dificulta manipular estadios embrionarios particulares. Para resolver esto, se propuso la centrifugación en gradientes de densidad discontinua de sacarosa, para separar los diferentes estadios embrionarios por su densidad ya que ésta depende de su condición fisiológica.

Se hicieron algunos ensayos para establecer la concentración de las soluciones de sacarosa a emplear y se encontró que con la preparación de un gradiente con concentraciones de sacarosa en agua al 30, 50, 70 y 90 % (p/v), se lograba una buena separación de los embriones de diferentes estadios de desarrollo.

##### IV.3.1 Preparación de los gradientes:

Se prepararon 4 soluciones de sacarosa en agua destilada o en solución de azida de sodio al 0.01 % (si eran preparados grandes volúmenes), a concentraciones de 30 %, 50 %, 70 % y 90 % (p/v) (Ver preparación de soluciones en el Apéndice III). La preparación de los gradientes se hacía poco antes de iniciar el ensayo (cosecha), y las soluciones de sacarosa se mantuvieron a baja temperatura (4°C).

Las soluciones de sacarosa se colocaron en tubos de centrífuga de 2.8 mm de diámetro x 10.3 mm de longitud, de la siguiente manera:

- 10 ml de la solución de sacarosa al 90 %, se colocaron en el fondo del tubo, utilizando una pipeta volumétrica.

- Luego se adicionaron con una pipeta Pasteur y por la pared del tubo, 10 ml de la solución de sacarosa al 70 %, muy cuidadosamente (para no romper la interface).

- Enseguida y de la misma manera, se adicionaron 10 ml de la solución al 50 %. Y finalmente, 10 ml de la solución al 30 %.

Una vez preparados, los tubos (con un volumen total de 40 ml), se mantuvieron en posición vertical durante no más de 2 horas antes de introducirlos a la centrífuga (a temperatura ambiente el gradiente se pierde rápidamente).

#### IV.3.2. Cosecha de callos con embriones somáticos

Se disgregaron mecánicamente aprox. 30 callos y se tamizaron a través de una malla tamaño 30, lavando el material en una caja de Petri de 90 mm de diámetro conteniendo agua destilada.

Fracción de ES

Eliminación del exceso de humedad

Registro del peso fresco total de los ES

Aplicación de la muestra en la superficie del gradiente preparado en tubos de centrifuga.

Centrifugación a 1500 x g durante 10 minutos.

Separación de c/fracción con una pipeta Pasteur de punta recortada (diám. aprox. 7 mm).

Las fracciones se lavaron con agua destilada a través de una malla tamaño 60 para eliminar la sacarosa. Luego se eliminó el exceso de agua

Determinación del peso fresco de cada fracción en platillos individuales tarados.

50 mg de ES fueron separados y secados en estufa a 50°C durante 24 horas para determinar su peso seco.

Extracción de proteínas de cada fracción.

La fracción de callo fue obtenida de aprox. 40 ml de agua destilada.

Centrifugación a 1500 x g durante 8 min.

Eliminación del sobrenadante por decantación.

Eliminación del exceso de humedad de la pastilla formada por las células del callo.

Determinación del peso fresco total.

La fracción de callo así obtenida se reservó para posterior análisis de proteínas.

#### IV.4. EXTRACCION DE PROTEINAS DE SEMILLAS Y ES DE ALFALFA A7034

En un mortero de porcelana previamente congelado con nitrógeno líquido, se pulverizó de 1 a 2 g de semillas de alfalfa, en presencia de aprox. 60 ml de nitrógeno líquido hasta la obtención de un polvo fino, el cual se transfirió a un homogenizador de vidrio esmerilado con macho de teflón previamente congelado y mantenido sumergido en hielo durante la prueba, el polvo se transfirió cuantitativamente lavando el mortero con pequeños volúmenes del amortiguador de extracción a utilizarse.

En el caso de los ES, éstos fueron macerados directamente en un homogenizador de vidrio esmerilado de 5 ml o de 1 ml, si la cantidad de ES era muy pequeña (por abajo de 200 mg), en cualquier caso, el homogenizador con el macho de teflón fue mantenido sumergido en hielo durante toda la prueba. La extracción se efectuó adicionando pequeños volúmenes del amortiguador de extracción al homogenizador con los ES y macerando con un taladro casero (aprox. 2500 rpm), se maceró durante 30 segundos, descansando durante 10 segundos, el tiempo total de macerado fue de 2 minutos.

La extracción de las diferentes clases de proteínas se realizó utilizando sus características de solubilidad:

Albúminas : Proteínas solubles en soluciones acuosas.

Globulinas: Proteínas solubles en soluciones salinas.

Prolaminas: Proteínas solubles en soluciones alcoholicas.

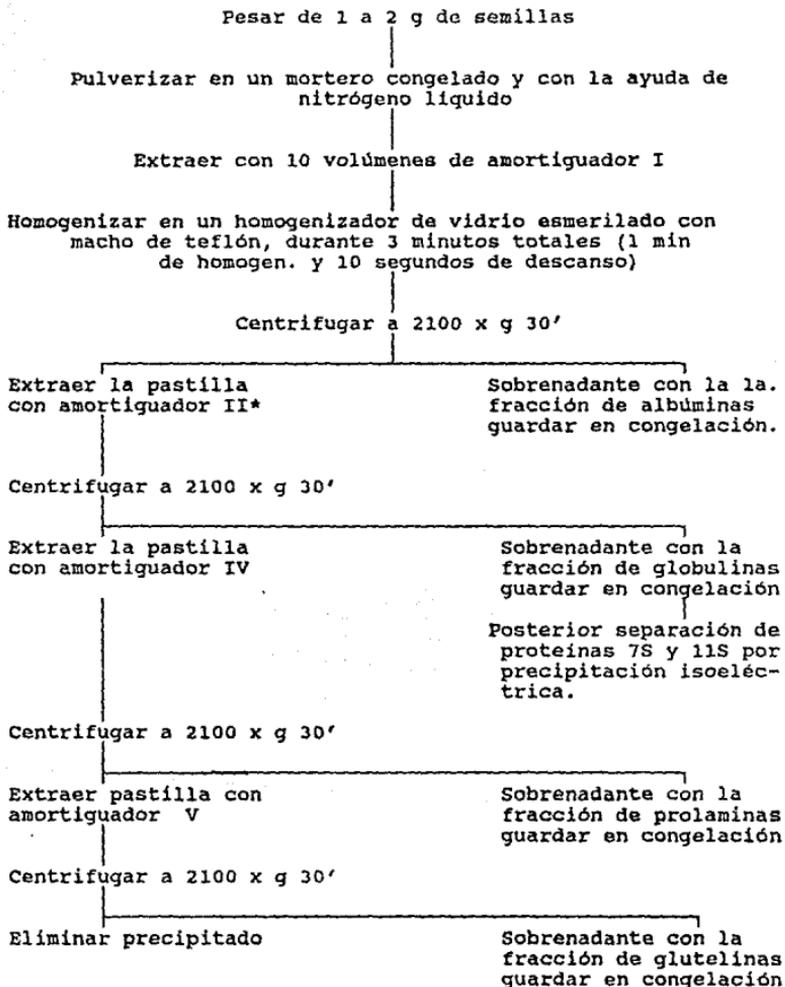
Glutelinas: Proteínas solubles en soluciones de ácidos o bases diluidas.

También se utilizaron sus características fisicoquímicas para su aislamiento y purificación parcial.

Las centrifugaciones se realizaron en una centrifuga Dupont Instrument Sorvall RC-5V refrigerated super speed centrifuge con un rotor SS-34 de 4.25 pulg. de diámetro.

Los protocolos de extracción empleados son los siguientes:

IV.4.1 PROTOCOLO PARA LA EXTRACCION DE PROTEINAS DE RESERVA  
EN SEMILLAS DE Medicago sativa L.



\* El amortiguador III es recomendado en la bibliografía para ser utilizando en sustitución del II o adicionalmente a este, para incrementar el rendimiento de la extracción (Stuart, 1985), sin embargo, para nuestro caso, no fue del todo favorable ya que el rendimiento en la extracción se incrementó en un 5-8 % solamente y los patrones obtenidos mostraron la presencia de un gran número de bandas contaminantes, por éstas razones las extracciones de globulinas fueron realizadas empleando únicamente el amortiguador II.

NOTA: Siguiendo el protocolo anteriormente descrito, se hicieron múltiples extracciones con diferentes pesos iniciales de semillas para determinar el grado de reproducibilidad de la técnica.

#### IV.4.2 EXTRACCION DE LAS GLOBULINAS 7S Y 11S

Dializar contra amortiguador VI\* durante 24 horas a temperatura ambiente c/agitación constante

Centrifugar a 2100 x g 30'

La pastilla principalmente constituida por la 11S, se redisuelve con amortiguador II y se conserva a -20°C.

Dializar sn contra agua desionizada con EDTA 10 mM y PMSF 200 µM durante 24 horas a 4°C.

Centrifugar a 2100 x g 30'

La pastilla principalmente constituida por la 7S, se redisuelve con amortiguador II y se conserva a -20°C.

Sobrenadante. Guardar en congelación.

\* Ver preparación de amortiguadores en el Apéndice IV.

#### IV.4.3. PROTOCOLO DE EXTRACCION DE PROTEINAS DE RESERVA DE EMBRIONES SOMATICOS DE ALPALPA.

Macerar cada fracción embrionaria en homogenizador de vidrio esmerilado con macho de teflón con 1x volumen de amortiguador I.

Macerar con un taladro casero (aprox 2500 rpm), durante 30 segundos y descansando 10 segundos, durante 2 minutos. Adicionar 1x volumen de amortiguador I.

Decantar el homogenado en viales de plástico de 1 ml. Lavar el homogenizador con 1x volumen de amortiguador I y decantar también el lavado en otro vial.

Marcar los viales y agitarlos en vórtex

Centrifugar en microfuga los viales equilibrados durante 2 minutos

El sobrenadante corresponde a la fracción de albúminas, colectarlo y medir el volumen, guardar en congelación. (Hacer 2 lavados).

La pastilla se resuspende en 1x volumen de amortiguador II

Agitar en vórtex

Centrifugar en microfuga durante 2 minutos  
Dar 2 lavados con amortiguador II

La fracción soluble corresponde a las globulinas, medir el volumen extraído y congelar. (Hacer 2 lavados).

Congelar pastilla

#### IV.5. CUANTIFICACION DE PROTEINAS:

La cantidad de proteína presente en cada una de las fracciones extraídas fue cuantificada mediante el método de Bradford (1976), utilizando azul de coomassie G-250. (Ver preparación de soluciones en el Apéndice V).

#### METODO:

Se prepararon por triplicado soluciones patrón de BSA (albumina de suero bovino), en agua bidestilada a concentraciones de 0, 20, 40, 60, 80 y 100  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  de acuerdo a la tabla 1 adicionando 5.0 ml de reactivo de Bradford. El contenido de cada tubo fue agitado inmediatamente en un vórtex y todos se dejaron reposar aprox. 15 minutos, se procedía entonces a leer la absorbencia de cada muestra en un espectrofotómetro Beckman Mod. DU-65 ajustado a 595 nm.

Las lecturas fueron tomadas contra un blanco de reactivos, preparado con 100  $\mu\text{l}$  de agua destilada y 5.0 ml de reactivo de Bradford y utilizando celdas de vidrio o plástico.

Para las muestras, se procedió de la misma manera, o si éstas tenían una alta concentración de proteína (lo que provoca una intensa coloración, que impide la lectura confiable de la muestra en el espectrofotómetro), se diluía con amortiguador I en el caso de albúminas y II en el caso de globulinas. Una vez obtenidas las lecturas, se hacía referencia a la curva tipo obtenida con las lecturas de la soluciones patrón, para determinar la concentración de proteína de las muestras.

TABLA 1. ORDENES DE DILUCION DE LAS MUESTRAS

Dilución	Fracción extraída
1:100	Para todas las fracciones extraídas de embriones somáticos
1:50	2da. fracción de globulinas
1:20	1a. fracción de globulinas y 2da. fracción de albúminas
1:10	1a. fracción de albúminas.

**ELABORACION DE LA CURVA PATRON:**

[BSA] ( $\mu\text{g}$ )	0	20	40	60	80	100
$\mu\text{l}$ de BSA (1 mg/ml)	0	20	40	60	80	100
$\mu\text{l}$ agua desion.	100	80	60	40	20	0
vol. reactivo (ml) de Bradford	5	5	5	5	5	5

Tabla 2.- Volúmenes de dilución de las soluciones para cuantificación de proteínas por Bradford.

Los resultados de la curva patrón fueron promediados y utilizados para la elaboración de gráficas y análisis de regresión lineal, calculándose la pendiente, ordenada al origen, índice de correlación y baricentro. Una vez realizado el ajuste de la recta y con la ecuación de ésta, se calculó la concentración de proteína presente en cada una de las muestras.

Las concentraciones calculadas de albúminas y globulinas en las diferentes fracciones fueron utilizadas para la elaboración de tablas cuyos componentes fueron:

- Fracción embrionaria
- Lectura de la absorbencia
- Concentración calculada con la ecuación de la recta de la curva tipo de BSA (1 mg/ml) en  $\mu\text{g}$  proteína/ml.
- Volumen colectado en la extracción para esa fracción
- Peso fresco de la fracción embrionaria correspondiente
- Concentración en mg proteína/g. de tejido, calculada de la siguiente manera:

Conc. en mg proteína/ml x volumen extraído (ml)

-----  
Peso fresco de la fracción extraída (g).

g)  $\mu\text{l}$  necesarios de cada extracto de proteínas para tener una solución cuya concentración fuera de  $42 \mu\text{g}/35 \mu\text{l}$  (en semillas se usó una concentración de  $420 \mu\text{g}/350 \mu\text{l}$ ). Estos valores fueron utilizados en la preparación de las muestras para la electroforesis en geles de poliacrilamida y SDS (SDS-PAGE).



### Preparación de las muestras para SDS-PAGE:

Una vez que se calcularon los volúmenes requeridos para tener una concentración de 42  $\mu\text{g}/35 \mu\text{l}$  en cada una de las muestras de ES y de 420  $\mu\text{g}/350 \mu\text{l}$  para las semillas, se adicionaron:

	ES	Semilla
Amortiguador de muestra (c/ $\beta$ -mercaptoetanol al 2%).....	10 $\mu\text{l}$ .....	100 $\mu\text{l}$
Agua destilada c.b.p.....	35 $\mu\text{l}$ .....	350 $\mu\text{l}$

Posteriormente se agitaron las muestras y se hirvieron durante 2 minutos, se agitó nuevamente y se hirvió por 5 minutos más. De ésta manera, las muestras quedaron listas para ser aplicadas a los geles; en el caso de los de 20 cm x 20 cm cada carril se cargó con 80  $\mu\text{l}$  de muestra y en el caso de los minigeles, los carriles se cargaron con 15  $\mu\text{l}$  de muestra; se utilizaron marcadores de bajo peso molecular de 10,000 a 100,000 D, los cuales se prepararon mezclando 10  $\mu\text{l}$  de sol. concentrada de marcadores marca Bio-Rad (No. Cat. 161-0304), 140  $\mu\text{l}$  de agua desionizada y 50  $\mu\text{l}$  de amortiguador de muestra, el volumen aplicado de marcadores por carril fue de 15  $\mu\text{l}$  para los geles de 14 cm x 16 cm y de 5-8  $\mu\text{l}$  en el caso de los minigeles.

Los marcadores de bajo peso molecular empleados fueron:

Proteína	Peso molecular
Fosforilasa B	95,500 kD
Albumina de suero bovino	66,200 kD
Ovoalbumina	45,000 kD
Anhidrasa carbónica	31,000 kD
Inhibidor de tripsina	21,500 kD
Lisozima	14,400 kD

### Condiciones de corrida:

La corrida electroforética fue a 27 miliamperes x gel durante 4 horas y de 30 mA x 75 minutos para los minigeles.

El teñido y desteñido de los geles se realizó como se indica en el apéndice VII.

### Determinación del patrón polipeptídico de las diferentes fracciones proteicas.

La determinación del peso molecular de cada uno de los constituyentes proteicos representados por las bandas obtenidas en la electroforesis, fue realizado en algunos casos con densitogramas obtenidos en un espectrofotómetro

Beckman Mod..y en otros por evaluación directa, midiendo las distancias recorridas entre los puntos de origen y el frente, refiriendo éstas a los valores de una gráfica construida por regresión lineal de el log. de los pesos moleculares de los marcadores de peso molecular y las distancias recorridas por cada uno de ellos. La fórmula utilizada para obtener los pesos moleculares fue la siguiente:

$$P.M. \text{ de la muestra} = \text{antilog}\{(D)(m)+(b)\}$$

donde:

m = pendiente de la curva construida con el log. de los marcadores de bajo P.M.

b = ordenada de la curva construida con el log. de los marcadores de bajo P.M..

Estos patrones polipeptidicos con sus respectivos pesos moleculares de cada muestra fueron registrados y comparados con los característicos de las proteínas 11S y 7S obtenidas de semillas.

#### IV.6.2. ISOELECTROENFOQUE

CAMARA: BioRad 1415

Fuente de poder: BioRad Mod. 1420

Recirculador: Lauca K-2/R

NOTA: Los geles para isoelectroenfoque se prepararon con un espesor de 3 mm.

A un matraz Kitasato se ensambló un filtro Millipore de 0.22  $\mu\text{m}$ , el cual estaba conectado a una jeringa de 10 ml, se adicionaban los siguientes reactivos en el orden que a continuación se indica:

Glicerol al 50 %	3 ml
Agua	4.5 ml
Anfolinas	
pH 3-10	0.1 ml
pH 4-6	0.2 ml
pH 6-8	0.2 ml

La mezcla fue filtrada y se adicionaron 4 ml de una mezcla de acrilamida-bis acrilamida (30 %-8 %), se filtró y desgasificó durante 20 minutos.

Una vez desgasificada la solución, se agregaron 5  $\mu\text{l}$  de TEMED y 15  $\mu\text{l}$  de persulfato de amonio al 10 % (recién preparado). Se mezcló perfectamente y se adicionó rápidamente a una placa de vidrio perfectamente limpia. Se dejó gelificar durante 30 minutos.

El gel se recorrió para establecer el gradiente a 2000 V durante 30 minutos.

En el extremo negativo del gel, se colocó una tira de papel filtro humedecido con NaOH 1 M y en el extremo positivo una tira de papel filtro humedecido con  $H_3PO_4$  1 M. Durante la recorrida y corrida se debía mantener una temperatura de 4°C.

Se colocaron después cuadritos de papel filtro alineados en el centro del gel, sobre los cuales se aplicó un volumen de 30  $\mu$ l de cada muestra. Se realizó entonces la corrida a 2000 V durante 2 horas. Una vez transcurrido éste tiempo se transfirió la placa de vidrio con el gel a un recipiente en donde se cubrió con solución de acetato de calcio 40 mM durante 10 minutos, de ésta manera fue separado el gel de la placa de vidrio y se tuvo mucho cuidado en su manejo para no perder el extremo ácido y básico.

Posteriormente se retiró la solución de acetato y se procedió a teñir el gel.

#### IV.6.3. ELECTROFORESIS EN DOBLE DIMENSION (O'Farrel)

Para la electroforesis en doble dimensión, las soluciones fueron preparadas como se indica en el Apéndice VIII.

La primera parte de éste método se refiere a la 1ª dimensión que permite la separación de las proteínas por su punto isoeléctrico.

Se emplearon tubos de vidrio de 14 cm de longitud, los cuales fueron cortados de pipetas volumétricas de 5 ml rotas. Los tubos se lavaron con mezcla crómica, enjuagados con agua destilada, lavados nuevamente con cloroformo, enjuagados con agua destilada y secados con calor.

Los tubos limpios se marcaron a 11.5 cm de longitud.

Preparación del gel:

Para 10 geles

5.5 g	UREA
1.33 ml	Sol. D
2.0 ml	Sol. E
2.0 ml	AGUA
0.4 ml	Anfolinas 5-7 pH
0.1 ml	Anfolinas 3-10 pH

Para 4 geles

1.84 g
0.46 ml
0.66 ml
0.66 ml
0.133 ml
0.033 ml

#### Desgasificación con vacío durante 10 minutos.

7 $\mu$ l	Persulfato de amonio 10 %	4 $\mu$ l
15 $\mu$ l	TEMED	6 $\mu$ l

Los tubos fueron sellados en un extremo con parafilm y eran llenados con las soluciones del gel hasta la marca con la ayuda de una jeringa, las burbujas que ocasionalmente se forman, fueron eliminadas con una aguja caliente.

La solución del gel en cada tubo, era aplanada con 10  $\mu$ l de agua, que se colocaron por la pared del tubo evitando así la formación de burbujas. Una vez hecho esto, los geles se dejaron polimerizar durante 2 horas a temperatura ambiente.

Una vez ocurrida la polimerización, se retiró el parafilm, los tubos se colocaron en la cámara y los geles se lavaron en los extremos superior e inferior con agua destilada, después toda el agua se retiró, utilizando tiras de papel filtro.

Se colocaron entonces por la paredes 15  $\mu$ l de amortiguador A y 15  $\mu$ l de amortiguador K, después los tubos se llenaron completamente con amortiguador del cátodo (NaOH 0.02 M desgasificado exhaustivamente). La cámara inferior se llenó con amortiguador del ánodo y la superior con amortiguador del cátodo, checando que no hubiera fugas.

Los geles se precorrieron dentro del cuarto frío durante los siguientes tiempos:

15 minutos a 200 V  
30 minutos a 300 V  
60 minutos a 400 V

Después de precorrerlos, se lavó la superficie de los geles y se secaron. Se colocaron entonces las muestras previamente disueltas en amortiguador A, agitándolas en vórtex y centrifugadas. Se sobreponían 10  $\mu$ l de amortiguador K.

Los tubos y la cámara superior fueron llenados con amortiguador del cátodo (NaOH 0.02 M) y los geles se corrieron a 400 V durante 20 horas.

Una vez hecha la corrida los tubos fueron retirados y los geles lavados en la superficie con agua, éstos se sacaron de los tubos mediante una jeringa o con una bomba peristáltica y fueron recibidos en 5 ml de amortiguador O (cuidando de no perder de vista los extremos ácido y básico), se equilibraron en ésta solución durante 1 hora.

NOTA 1: En el caso de que la segunda dimensión no se realizara inmediatamente, los geles eran congelados a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

NOTA 2: En el caso de que la 2da. dimensión no se realizara y se quisiera teñir el gel de isolectroenfoque, éste se debía recibir directamente en agua y pasarse a una solución para remover anfolinas preparada de la siguiente manera:

Metanol	50 ml
TCA 100 %	8.33 ml
Ac. sulfosalicílico	28.66
Agua	116.66 ml

Los geles se mantuvieron en ésta solución durante 10 minutos agitando suavemente, hasta adquirir una coloración blanca, posteriormente fueron enjuagados, teñidos durante 60 minutos y desteñidos (Las soluciones de teñido y desteñido, se describen posteriormente).

Los geles de poliacrilamida y SDS para la 2da. dimensión, fueron preparados de la misma manera que ya se describió anteriormente con un espesor de gel concentrador de 1 cm. Sobre éstos geles se colocó un poco de solución P (caliente) y el gel de isoelectroenfoque, el cual fue posteriormente cubierto con más solución P.

La corrida electroforética se inició a 14 mA hasta que las proteínas pasaran al gel de corrida y después se dejó correr a 28 mA durante 5 horas.

Los geles fueron retirados de la cámara de electroforesis y se tiñeron durante 1 hora en una solución de Azul de coomassie al 0.1 %, etanol 50 % y ácido acético al 7 %. El desteñido de los geles se realizó en una solución de ácido acético al 8 % y etanol al 25 % en agua.

#### IV.6.4. ANALISIS INMUNOELECTROFORETICO DE LAS PROTEINAS DE RESERVA

La última prueba analítica para el caso de las proteínas fue la de "Rocket" inmunolectroforesis, para lo cual se obtuvieron anticuerpos específicos contra las proteínas IIS y 7S obtenidas de semillas de alfalfa.

#### Obtención de anticuerpos policlonales vs. proteínas de reserva de alfalfa

Con el objetivo de obtener anticuerpos tejido-específicos vs. las proteínas de reserva (globulinas), éstas fueron extraídas de semillas de alfalfa purificadas, desnaturalizadas y dializadas (para eliminar el agente reductor  $\beta$ -mercaptoetanol). Después de ser preparadas de esta manera, fueron inoculadas a conejos, para la posterior obtención de anticuerpos policlonales contra dichas proteínas; los sueros obtenidos con éstos extractos fueron capaces de reconocer antígenos preferencialmente acumulados en las semillas, en los embriones somáticos y ocasionalmente en los callos embriogénicos.

## Desnaturalización de proteínas de reserva para inmunización de conejos:

Se calculó la cantidad (en  $\mu\text{l}$ ), de los extractos de proteínas de semillas (previamente centrifugados en microfuga durante 5 minutos), necesaria para obtener concentraciones finales de 2.0 y 1.0 mg/ml, éstas soluciones fueron desnaturalizadas utilizando 500  $\mu\text{l}$  de un amortiguador de muestra sin azul de bromofenol (ver apéndice IV), y aforando a 1 ml con agua, a ésta solución se le adicionaban 25  $\mu\text{l}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol.

Posteriormente las muestras se hirvieron durante 2 minutos y se agitaron en vórtex, después se hirvieron nuevamente durante 5 minutos y se agitaron. Una vez denaturalizadas, las muestras se dializaron contra agua a temperatura ambiente durante toda la noche, para eliminar el  $\beta$ -mercaptoetanol. Las muestras se resuspendieron finalmente en solución fisiológica, quedando listas para ser inoculadas a los conejos.

## INMUNIZACION

Se inmunizaron 4 conejas (2 para cada uno de los extractos proteicos correspondientes a la 11 S y a la 7 S), con dosis iniciales de 2 mg/ml de proteína con adjuvante de Freud completo, inyectando en el dorso del animal de manera subcutánea. A los 7 días se inoculó el antígeno a una dosis de 1 mg/ml con adyuvante de Freud incompleto en la región vecina a los granulomas formados como respuesta a la primera inmunización. Posteriormente se inoculó a los 15 días la misma dosis, por vía intravenosa inyectando en la oreja, esta operación se repitió 15 días después. 7 días después de la última inmunización, se realizó el primer sangrado por la oreja, obteniéndose alrededor de 25 ml de sangre por coneja.

Posteriormente se hicieron reinmunizaciones con la misma dosis y por vía intravenosa inyectando en la oreja y sangrando por la arteria de la misma a los 7 días de cada reto. Finalmente se hicieron sangrados a blanco.

De la sangre obtenida de cada coneja, se inducía la formación del coágulo a baja temperatura o en estufa a 37°C y el suero era limpiado centrifugando a 858 x g por 10 minutos. Este era conservado a -4°C en viales de plástico de 1 ml bien identificados.

Las pruebas preliminares de éstos sueros fueron por Ouchterlony, inmunodifusión radial en placas (portaobjetos) de agarosa al 2 % con perforaciones de 2.5 mm de diámetro y revelando con azul de coomasie R-250. Los sueros con los títulos más altos, fueron empleados para el "Rocket" inmunolectroforesis.

#### IV.6.5. "ROCKET" INMUNOELECTROFORESIS:

Preparación de las muestras para "Rocket" inmunolectroforesis:

(Ver preparación de soluciones en el Apéndice IX).

De una muestra nativa de globulinas de semilla (no reducida con  $\beta$ -mercaptoetanol), con una concentración de proteína conocida de 1 mg/ml, se hicieron diluciones sucesivas 1:2 para obtener concentraciones de 1250, 625, 312, 156, 78 y 39 ng/5  $\mu$ l, utilizando solución de boratos 0.1 M pH 8.6 como diluyente. De estas soluciones se prepararon 100  $\mu$ l de cada una, adicionándoles 2  $\mu$ l de sol. de azul de bromofenol y se conservaron en viales de plástico en congelación. Posteriormente se utilizaron para hacer una curva tipo y se colocaron en cada placa de ensayo como referencia.

Las muestras de globulinas de embriones somáticos a analizarse, se prepararon colocando 25  $\mu$ l del extracto nativo en viales de plástico con 25  $\mu$ l de solución de Boratos 0.1 M pH 8.6 y 2  $\mu$ l de sol. de azul de bromofenol. En algunos casos en los que los inmunoprecipitados formados eran muy pequeños, la corrida se repitió para esas muestras y se usaron directamente, sin dilución. O en el caso contrario en que el exceso de antígeno provocaba deformación de los "Rockets", el antígeno era diluido.

#### Procedimiento:

Sobre un soporte de acrílico de 25 x 25 cm, nivelado horizontalmente con la ayuda de una burbuja, se colocó una placa de vidrio de 10 cm x 10 cm perfectamente limpia, sobre la cual se vertieron 15 ml de solución fundida de agarosa al 1.5 % (p/v) en solución de boratos 0.1 M pH 8.6, conteniendo 150  $\mu$ l de antisuero anti-globulina disuelto para dar una concentración final de antisuero de 1.0 % (v/v). La agarosa se depositó y se extendió rápidamente con una pipeta precalentada ligeramente en un mechero; con la ayuda del mismo se eliminaron las burbujas de aire que quedaran atrapadas en la superficie.

La agarosa se solidificó a temperatura ambiente y posteriormente se perforó con un sacabocados de 2.5 mm de diámetro marca BioRad, conectado a vacío mediante una manguera. Se hicieron 12 pozos a 1 cm del borde inferior de la placa, con una separación de aprox. 6 mm entre cada uno de ellos, para esto se utilizó como guía, una plantilla de cartulina con la posición deseada de los pozos.

La placa perforada, fue entonces colocada sobre el soporte horizontal de una cámara de inmunolectroforesis,

cuyos depósitos fueron previamente llenados con 650 ml de solución de corrida cada uno (Boratos 0.1 M pH 8.6). Se tenía especial cuidado de que los pozos quedaran alineados paralelamente con los depósitos.

El sistema de enfriamiento de la cámara, fue conectado a la llave de agua corriente y el agua fue drenada a través de la cámara, hacia la tarja.

Las muestras con azul de bromofenol, fueron colocadas rápidamente en los pozos (para evitar la difusión). La aplicación fue de 5  $\mu$ l en cada pozo y no se colocó muestra en los pozos laterales.

La solución de los depósitos de la cámara, fue conectada con los extremos del gel mediante almohadillas de algodón de 10 x 10 cm envueltas en gasa y previamente humedecidas con la misma solución.

Se cerró entonces la cámara y se conectó a la fuente de poder, la cual encendida, se ajustó a 50 Volts durante 4 horas (en el caso de hacer el ensayo con geles en portaobjetos se ajustó a 20 volts durante 90 minutos).

Una vez terminada la corrida electroforética, la placa se retiró de la cámara y las proteínas no inmunoprecipitadas se extrajeron, sumergiendo los geles en 1000 ml de NaCl 0.1 M durante toda la noche y posteriormente en 1000 ml de agua bidestilada durante 2 horas. Luego los geles se comprimieron sobre la mesa, durante 15 minutos entre dos toallas de papel desechable (sanitas), con la ayuda de un objeto de aproximadamente 1 Kg de peso; posteriormente se colocaron dentro de un horno a 60°C durante 20 minutos o hasta que estuvieran completamente secos.

#### **Teñido y desteñido de los "Rocket"s:**

Los geles secos fueron teñidos por inmersión durante 15 minutos en la sol. de tinción (ver Ap. IX). Posteriormente eran enjuagados con agua corriente para eliminar el exceso de colorante y sumergidos en sol. desteñidora, solamente el tiempo necesario para eliminar el fondo azul.

#### **Optimización del sistema de "Rocket" inmunoelectroforesis**

Para realizar la inmunoelectroforesis se requirió de hacer algunas pruebas para establecer las concentraciones óptimas de anticuerpos y antígenos a usar, así como la corriente y los tiempos de corrida para obtener los mejores "Rocket"s.

Estos experimentos fueron los siguientes:

1) Efecto de cantidades variables de antígeno (globulinas de semilla de alfalfa) y una cantidad fija de antisuero (anti-globulinas), sobre la altura de los inmunoprecipitados en "Rocket".

2) Efecto de cantidades mayores a 1250 ng de antígeno (globulinas de semillas de alfalfa), con una cantidad fija de suero de conejo anti-globulinas, sobre la altura de los inmunoprecipitados en "Rocket".

3) Efecto de cantidades variables de suero de conejo antiglobulinas, sobre la altura de inmunoprecipitados en "Rocket"s con una cantidad fija de antígeno (globulinas de semillas de alfalfa).

4) Efecto de cantidades variables de antisuero de conejo (anti-globulinas) y una cantidad fija de antígeno carbamylado (globulinas de semillas de alfalfa), sobre la altura de los inmunoprecipitados en "Rocket".

5) Efecto de la carbamylación el antígeno (globulinas de semillas de alfalfa), sobre la altura de los inmunoprecipitados en "Rocket" con cantidades variables de antígeno.

Una vez realizados éstos experimentos y encontradas las mejores concentraciones de antígenos y anticuerpos, así como optimizado las condiciones de corrida, se realizaron los ensayos para el análisis de los extractos de proteínas de embriones somáticos obtenidos con las diferentes condiciones experimentales.

#### IV.6.6. DETERMINACION DE ACTIVIDAD HIDROLITICA DE ALFA-AMILASA

Otras biomoléculas, como los carbohidratos, pueden ser muy útiles para realizar el seguimiento del desarrollo embrionario y sus diferentes aspectos, sin embargo el análisis de los cambios en éstas no ha sido abordado plenamente en sistemas de embriogénesis somática *in vitro*.

En este trabajo, se trató de determinar si ocurren cambios importantes en los niveles de almidón durante el desarrollo embrionario, la evaluación de esto fue realizada de forma indirecta, ya que se determinó mediante cambios en los niveles de actividad de la enzima alfa-amilasa, presente en las fracciones de albúminas de los extractos de proteínas de diferentes estadios de desarrollo.

La estimación de los niveles de actividad enzimática fue realizada en placas de agar al 2.0 % p/v, conteniendo almidón al 0.2 % p/v, la presencia y actividad de la alfa-amilasa, fue evidenciada por los halos formados en las zonas de

aplicación de extractos de albúminas de ES, al ser revelados después de su incubación con solución de yodo-yoduro de potasio (Ver preparación de esta solución en el Apéndice X).

#### Preparación de placas de agar-almidón para la determinación de alfa-amilasa

Se prepararon 400 ml de una solución de almidón al 0.2 % en amortiguador de fosfatos pH 6.0 (Solución 1). De ésta solución se transfirieron 150 ml a un matraz aforado de 200 ml, donde se le adicionaron 20 ml de una solución de  $\text{CaCl}_2$  200 mM, se mezcló y aforó con la misma solución 1 para tener una concentración final de 20 mM de  $\text{CaCl}_2$  (Sol. 2).

A 200 ml de las sols. 1 y 2, se les adicionaron respectivamente 4.0 g de agar (concentración final 2.0 %), se calentaron hasta disolver completamente el agar, y se colocaron aproximadamente 10 ml de cada solución en cajas de Petri de plástico o vidrio de 90 mm x 15 mm. Una vez solidificado el agar se perforaba con un sacabocados de 4 mm de diámetro. Los pozos eran dispuestos de forma circular a 1.5 cm del borde de la caja y uno en el centro. En cada pozo se colocaron 5  $\mu\text{l}$  de cada una de las muestras de los extractos de albúminas de los embriones somáticos y en el centro 5  $\mu\text{l}$  de alfa-amilasa purificada de aleuronas de semillas de trigo con una potencia de 10 U/ml y a una dilución de 1:20. Concentración final: 2.5 U/5  $\mu\text{l}$ .

Las placas se incubaron en una estufa a 37°C durante 12 y 24 horas. Una vez terminado el periodo de incubación, se revelaba la hidrólisis del almidón (en forma de halos blancos), presente en la placa mediante solución de Yodo-Yoduro que se mantuvo en la caja por espacio de 10 minutos. Una vez revelados los halos se midieron directamente con el uso de una escala milimétrica, el diámetro alcanzado por éstos tanto en el control como en las muestras problema, fue registrado y comparado con los obtenidos para la misma muestra pero con diferentes tiempos de incubación.

Esta determinación indirecta de la actividad de alfa-amilasa, fue útil sobre todo para ubicar los momentos de actividad metabólica de los embriones en diferentes estadios de desarrollo.

#### IV.7. CINETICA DE DESARROLLO.

##### IV.7.1 CONDICIONES EXPERIMENTALES:

Se hicieron varias siembras in vitro de peciolos con un tamaño de lote de entre 200 y 300 explantes, para inducir embriogénesis somática. Se propuso que las siembras fueran efectuadas con una frecuencia de 3, 6 ó 9 días (dado que las cosechas se harían cada 3 días) y de acuerdo a un esquema de siembras como el siguiente:

Siembra	Cosechar
1	Estadios de desarrollo avanzados. Días 39 y 42, fotoperiodo, oscuridad y control
2	Estadios maduros. Días 33 y 36, fotoperíodo, oscuridad y control
3	Estadios tempranos. Días 27 y 30, fotoperiodo, oscuridad y control
4	Estadios iniciales. Días 21 y 24, fotoperiodo, oscuridad y control
5	Callos a termino de inducción. Días 15 y 18, fotoperíodo y control.
6	Peciolos con callos de formación temprana. Días 9 y 12, fotoperiodo y control.
7	Peciolos hinchados Día 6, fotoperíodo y control.
8	Peciolos. Día 3, fotoperíodo y control.

Así, los embriones que se obtuvieron en las primeras siembras, se dejaron continuar en desarrollo para cosecharlos en los estadios de desarrollo más tardíos (día 42), y las últimas siembras fueron realizadas para obtener las cosechas correspondientes a la fase de inducción (formación y proliferación de callos).

Las cosechas realizadas consistieron en tomar el número de callos que tuvieran un peso total de entre 1.5 y 2.0 g. En el momento de la cosecha, fueron evaluados los índices de respuesta, rendimiento (a partir de los 21 días o una vez que los embriones ya eran evidentes) y germinación (desde los estadios de torpedo joven, para evaluar germinación precoz); se procedió entonces a separar los diferentes estadios embrionarios por centrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa, determinando su peso fresco y seco; cada estadio

embrionario fue sometido a extracción de proteínas de reserva de acuerdo al protocolo antes mencionado. En las fracciones de albúminas y globulinas de cada estado de desarrollo, se determinó el contenido de proteínas por Bradford y su composición polipeptídica por SDS-PAGE, utilizando marcadores de bajo peso molecular.

Este análisis fue realizado simultáneamente para los embriones obtenidos en fotoperiodo y en oscuridad. Posteriormente, los extractos de proteínas de los diferentes estadios embrionarios de los diferentes días de cultivo, fueron analizados por "Rocket" inmunolectroforesis y también fue determinada la actividad hidrolítica de la alfa-amilasa presente.

El protocolo de cosechas utilizado para este experimento fue el siguiente:

Se seccionaron de 40-50 peciolo de alfalfa A7034 de plantas mantenidas en condiciones de invernadero.

Se procedió a la desinfección de los peciolo en etanol al 70 % durante 30 segundos y posteriormente en hipoclorito de sodio al 1.2 % durante 8 minutos.

Los explantes fueron inoculados en medio B<sub>5</sub> de inducción (c/reg. de crecimiento) y cultivados en fotoperiodo durante 18 días.

Las cosechas se iniciaron desde el día de cultivo # 3 y se continuó cosechando cada 3 días hasta el día de cultivo # 42.

A los 18 días el lote fue dividido en 2 partes iguales.

Los callos obtenidos en la inducción se transfirieron a medio B<sub>5</sub> de desarrollo (s/reg. de crecimiento) y se continuó cosechando cada 3 días.

La mitad del lote se cultivó en condiciones de fotoperiodo durante 24 días.

La otra mitad se cultivó en condiciones de oscuridad, durante 24 días.

Una vez concluida la primer serie completa de cosechas, se hicieron repeticiones de éstas, durante los tratamientos de manipulaciones de medio con los controles de los mismos y con lotes de repetición, contándose con un total de 3 repeticiones promedio para cada cosecha.

Con los datos obtenidos de este experimento, se elaboraron gráficas de respuesta, rendimiento y crecimiento, se determinó también el % en peso de cada fracción embrionaria en el cultivo después de ser separadas por el gradiente de densidad discontinua de sacarosa, el contenido de proteínas de los extractos de albúminas y globulinas de todas las muestras obtenidas durante la extracción de todas las fracciones embrionarias, la relación albúminas/globulinas, así como el seguimiento de los cambios en el patrón polipeptídico de las fracciones proteicas embrionarias obtenidas y su comparación con el patrón característico de la semilla. También se evaluaron los cambios durante el desarrollo en el tipo de proteínas sintetizadas mediante el análisis en "Rocket" inmunoelectroforesis.

#### IV.8. MANIPULACIONES DE MEDIO

Una vez que se determinaron los cambios en los niveles de proteínas y patrones polipeptídicos de las mismas en los diferentes estadios del desarrollo embrionario mediante la cinética de crecimiento, se ubicaron los momentos más importantes de síntesis y degradación de las proteínas de reserva durante el cultivo *in vitro*. Con estos datos se diseñaron los experimentos de manipulaciones de medio, para los cuales se consideraron 3 agentes que fueron aplicados exógenamente al medio de cultivo: ABA  $10^{-5}$  M, sorbitol a concentraciones de 2, 8 y 12 % y extracto de embriones sexuales inmaduros a una concentración de 2 g/l.

##### IV.8.1 SORBITOL

En el caso del sorbitol, se decidió trabajar con 3 diferentes concentraciones: 2, 8 y 12 %, las cuales son similares a las reportadas por otros autores que han trabajado con diversas especies y con las cuales han obtenido resultados satisfactorios con respecto a la calidad y cantidad de las proteínas de reserva obtenidas (Finkelstein y Crouch, 1986). Y por otro lado, para poder ubicar de manera general el rango de concentraciones en los que se encontrara un efecto en los niveles de proteína, que posteriormente pudiera ser utilizado para establecer un rango de concentraciones más preciso (en el caso de que fuera favorable el efecto).

Con los resultados de la cinética de crecimiento se determinó el cambio en el contenido de proteínas de reserva con respecto al tiempo y se pudo ubicar los momentos en que sería más favorable la exposición del tejido a éste agente.

El sorbitol, fue introducido en la fase media inicial del desarrollo (3 días antes de alcanzar los máximos niveles de síntesis), con el fin de que una vez que los embriones somáticos ya estuvieran sintetizando grandes cantidades de proteínas de reserva, se provocara la deshidratación del tejido y se inhibiera su crecimiento, disminuyendo su peso fresco e incrementando su peso seco. Esto fue planeado teniendo en mente que los embriones somáticos pueden seguir sintetizando proteínas de reserva en condiciones de déficit hídrico, como lo reportan algunos autores (Finkelstein y Crouch, 1936).

El protocolo de cultivo para este experimento fue el siguiente:.

SIEMBRA EN MEDIO DE INDUCCION  
18 DIAS EN FOTOPERIODO

TRANSFERENCIA A MEDIO DE DESARROLLO B<sub>5</sub> S/R  
CULTIVO HASTA EL DIA 28 EN FOTOPERIODO

CAMBIO A MEDIO DE DESARROLLO SUPLEMENTADO CON  
SORBITOL MAS 3 % DE SACAROSA, EN FOTOPERIODO

CONTROL    2 % SORBITOL    8 % SORBITOL    12 % SORBITOL

1a. COSECHA A LOS 35 DIAS  
análisis\* de las muestras y ensayos de germinación

2da. COSECHA A LOS 42 DIAS  
análisis\* de las muestras y ensayos de germinación

Análisis\* de las muestras:

Separación en gradiente  
Peso seco y fresco  
Cuantificación de proteínas  
Patrón electroforético  
Inmunodetección

Germinación

Medio MS al 50 %  
en condiciones de  
fotoperiodo.

#### IV.8.2 ACIDO ABSICIBICO

En cuanto al ABA  $10^{-5}M$  (P. M.: 264.31), se trata también de un agente y de una concentración recomendada por varios autores, que han trabajado sobre los efectos que causa éste ácido sobre la inhibición de la germinación precoz. La idea en nuestro caso fue introducirlo antes de la fase de degradación o disminución en los niveles de las proteínas de reserva, los tiempos fueron estimados de acuerdo a los resultados obtenidos en la cinética de crecimiento, la cual permitió ubicar los momentos críticos de síntesis y degradación de las proteínas. Se propuso realizar la exposición del tejido al agente por periodos de 7 días (no se tenían muchas bases para determinar si éste tiempo era muy largo o corto), consecutivos en el tiempo. El diseñar el experimento de esta manera, tuvo como objetivo el tratar de evitar la pérdida de las proteínas sintetizadas en el momento y las ya existentes, así como la germinación precoz; considerando que en la bibliografía se reporta que con este agente se detiene momentáneamente el desarrollo embrionario. En el caso de los embriones somáticos, se trabajó además en condiciones de oscuridad, por haber antecedentes de fotodescomposición del ABA. Esto se realizó envolviendo los frascos de cultivo experimentales y controles en papel aluminio y colocándolos en cajas de cartón dentro del cuarto de cultivo a la temperatura ya descrita.

El único antecedente de la utilización de este agente en el sistema de alfalfa, fue realizado anteriormente por Peña en 1989. En este trabajo se trato de determinar si había cambios importantes en los niveles de proteínas de reserva mediante algunas manipulaciones de medio como ABA a 0.5 mg/l, Sacarosa 33 % + Manitol 66 %, PEG 1000 al 10 %, en condiciones de fotoperíodo y con tratamientos de oscuridad sin ningún agente, además se hizo combinación de éstos tratamientos. Sin embargo en los resultados de éstos tratamientos con manipulaciones de medio, no se obtuvo una mejoría en cuanto a los niveles de proteínas de reserva en relación con los controles cultivados en condiciones basales.

El diseño de este experimento considerando los tiempos de cultivo es presentado a continuación.

SIEMBRA EN MEDIO DE INDUCCION  
18 DIAS EN FOTOPERIODO

TRANSFERENCIA A MEDIO DE DESARROLLO B<sub>5</sub> S/R  
CULTIVO HASTA EL DIA 28 EN FOTOPERIODO

CAMBIO A MEDIO CON  
ABA 10<sup>-5</sup> M

CONTINUACION DEL CULTIVO  
EN MEDIO DE DESARROLLO  
HASTA EL DIA 35.

COSECHA DE MEDIO LOTE  
EL DIA 35.  
Análisis\* y germinación.

CAMBIO A MEDIO CON  
ABA 10<sup>-5</sup> M.

COSECHA DEL RESTO DEL  
LOTE EL DIA 42.  
Análisis y germinación.

COSECHA EL DIA 42  
Análisis y germinación.

NOTA: EL CONTROL SE LLEVO A CABO COMO EN EL EXPERIMENTO  
ANTERIOR.

Análisis\* de las muestras:

Germinación

Separación en gradiente  
Peso seco y fresco  
Cuantificación de proteínas  
Patrón electroforético  
Inmunodetección

Medio MS al 50 %  
en condiciones de  
fotoperiodo.

#### IV.8.3 EXTRACTO DE EMBRIONES SEXUALES INMADUROS

Otro de los agentes que se propuso utilizar fue el Extracto de Embriones Cigóticos inmaduros (EEC). El uso de los EEC, fue planeado considerando que se trataba de emplear en medio químicamente indefinido. Sin embargo, esto es justificado de alguna manera, mediante la hipótesis de que si los embriones somáticos germinan precozmente y no acumulan cantidades importantes de proteína debido a la carencia de algún agente modulador que no puede estar presente en el cultivo *in vitro* (dadas las condiciones de éste), entonces la aplicación de un extracto de embriones sexuales que obviamente debe contener todos estos agentes moduladores, podría producir algún efecto en los niveles de proteínas y en la germinación precoz. Se consideró además que la fracción de albúminas era la más indicada para utilizarse dado que en esta fracción se encuentra una gran cantidad de moléculas de bajo peso molecular, entre las cuales sería más factible obtener éstos agentes moduladores.

Se planeó introducir este agente, desde la transferencia de los embriones somáticos del medio de inducción al medio de desarrollo. Se trató de llevar el desarrollo *in vitro* de manera paralela al desarrollo *in vivo*, incubando los ES durante la 1a. semana de desarrollo en medio suplementado con EEC de 15 días p.a., la 2da. semana de desarrollo, los ES fueron incubados en medio suplementado con EEC de 30 días p.a., y la 3a. semana de desarrollo los ES fueron incubados en medio de desarrollo suplementado con EEC de 45 días p.a.

Para la obtención de los EEC, fue necesario asistir al INIFAP Campo Agrícola Experimental "El Horno" con el M. en C. Luis Castro Acero; quien dió las facilidades para disponer de inflorescencias de alfalfa y posteriormente de vainas de alfalfa de la variedad mexicana Puebla 76, a los 15, 30, 45 y 60 días después de la polinización. Estas vainas fueron abiertas manualmente en el laboratorio y se extrajeron las semillas inmaduras, las cuales fueron pesadas y utilizadas para extracción de proteínas. Los extractos así obtenidos correspondientes a la fracción de albúminas, se emplearon en la preparación de los medios de cultivo a una concentración de 2 g/l de medio. Hubo dos tratamientos del extracto: uno que fue esterilizado por autoclave y otro que lo fue por filtración a través de membranas de 0.22  $\mu\text{m}$ , ya que se temía que de haber algún compuesto regulador importante, éste fuera termolábil.

El protocolo de cultivo para este experimento es el siguiente.

SIEMBRA EN MEDIO DE INDUCCION  
18 DIAS EN FOTOPERIODO

TRANSFERENCIA A MEDIO DE DESARROLLO B<sub>5</sub> S/R  
CULTIVO HASTA EL DIA 21 EN FOTOPERIODO

CAMBIO A MEDIO DE DESARROLLO SUPLEMENTADO CON  
EEC DE 15 DIAS p.a. CULTIVO HASTA EL DIA 28

COSECHA DE 1/3 DEL LOTE  
EL DIA 28.  
Análisis\* y germinación

TRANSFERENCIA DEL RESTO  
DEL LOTE A MEDIO DE DE-  
SARROLLO SUPLEMENTADO  
CON EEC DE 30 DIAS p.a.  
CULTIVO HASTA EL DIA 35.

COSECHA DE 1/3 DEL LOTE  
EL DIA 35.  
Análisis y germinación

TRANSFERENCIA DEL RESTO  
DEL LOTE A MEDIO DE DE-  
SARROLLO SUPLEMENTADO  
CON EEC DE 30 DIAS p.a.  
CULTIVO HASTA EL DIA 35

COSECHA DEL RESTO DEL  
LOTE EL DIA 42.  
Análisis y germinación.

Análisis\* de las muestras:

Separación en gradiente  
Peso seco y fresco  
Cuantificación de proteínas  
Patrón electroforético  
Inmunodetección

Germinación

Medio MS al 50 %  
en condiciones de  
fotoperiodo.

NOTA 1 : EEC: EXTRACTO DE EMBRIONES SEXUALES INMADUROS  
A UNA CONCENTRACION DE 2 g/l.

NOTA 2: EL CONTROL SE CORRIO COMO EN LOS EXPERIMENTOS  
ANTERIORES.

#### IV.9. APENDICES

##### APENDICE I

###### Preparación de la solución de hipoclorito de sodio al 1.2 % v/v de cloro activo:

De una solución comercial de hipoclorito de sodio con una concentración de 6.0 % de cloro activo, tomar 30 ml y transferirlos a una probeta graduada de 100 ml, diluir y aforar a 100 ml con agua destilada.

La concentración final de ésta solución es de 1.2 % v/v de cloro activo.

##### APENDICE II

###### Medios de cultivo empleados:

MACRONUTRIMENTOS	MS (mg/l)	MS modif. (mg/l)	B <sub>5</sub> e (mg/l)
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	400	-
KNO <sub>3</sub>	1900	03538	2528
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370	370	500
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	-	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	-	-	150
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> cit. dibásico	-	-	2827
CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	332	332	151
MICRONUTRIMENTOS			
KI	0.88	0.88	0.75
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	6.2	3.0
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	16.9	16.9	10.0
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.5	8.5	2.0
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25	0.25	0.25
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.25	0.25	0.25
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.25	0.25	0.25
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3	37.3	37.3
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8	27.8	27.8

##### APENDICE III

###### Preparación de las soluciones de sacarosa para el gradiente:

Pesar con exactitud la cantidad de sacarosa especificada en la tabla siguiente de acuerdo al % de sacarosa en solución que se va a preparar:

% deseado	Cant. de sacarosa
30 %	30 g
50 %	50 g
70 %	70 g
90 %	90 g

En matraces Erlenmeyer individuales de 200 ml, disolver la sacarosa con 80 ml de agua destilada y bajo agitación magnética (en el caso de la solución al 90 %, puede ser necesario aplicar calor).

Transferir cada solución a matraces aforados de 100 ml o a probetas graduadas de 100 ml, medir el volumen y adicionar pequeños volúmenes de agua a los matraces Erlenmeyer para lavar las paredes, adicionar estos lavados a las probetas o matraces volumétricos y aforar con agua destilada.

#### APENDICE IV

##### Composición de los amortiguadores usados en la extracción y precipitación de proteínas:

Amortiguador I	Fosfatos 50 mM, PMSF 200 $\mu$ M y EDTA 10 mM. pH 7.0.
Amortiguador II	Fosfatos 50 mM, PMSF 200 $\mu$ M, EDTA 10 mM y NaCl 1 M pH 7.0.
Amortiguador III	Fosfatos 50 mM, PMSF 200 $\mu$ M, EDTA 10 mM, NaCl 1 M y DTT 10 mM. pH 7.0.
Amortiguador IV	Fosfatos 50 mM, PMSF 200 $\mu$ M, EDTA 10 mM, en propanol al 70 %. pH 7.0.
Amortiguador V	Fosfatos 50 mM, PMSF 200 $\mu$ M, EDTA 10 mM y NaOH al 0.1 N pH 7.0.
Amortiguador VI	Acetatos 50 mM, PMSF 200 $\mu$ M, EDTA 10 mM y NaCl 1 M. pH 4.75

#### APENDICE V

Soluciones y Reactivos para Bradford:

##### Sol. stock de albúmina de suero bovino (BSA):

Pesar con exactitud 100 mg de albúmina de suero bovino Sigma y disolver con agitación magnética en 60 ml de agua bidestilada, diluir y aforar en un matraz volumétrico de 100 ml. Conservar en refrigeración.

### Reactivo de Bradford:

Preparar una solución disolviendo 0.1 g de azul de Coomassie G-250 en 50 ml de etanol al 95 %. Agregar 100 ml de H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> al 85 % y aforar con agua bidestilada a 1000 ml, filtrar y guardar en oscuridad.

### APENDICE VI

#### SOLUCIONES PARA SDS-PAGE:

##### AMORTIGUADOR DE MUESTRA CON AZUL DE BROMOFENOL:

Componentes	para 100 ml	Conc final (% v/v)
Tris-HCl 1M pH 6.8	10.32 ml	10.32
SDS al 25 %	10.0 ml	10.0
Glicerol	2.5 ml	2.5
Azul de bromofenol	3.0 ml	3.0

##### AMORTIGUADOR DE MUESTRA SIN AZUL DE BROMOFENOL:

Componentes	para 100 ml	Conc final (% v/v)
Tris-HCl 1M pH 6.8	10.32 ml	10.32
SDS al 25 %	10.0 ml	10.0
Glicerol	2.5 ml	2.5

#### AMORTIGUADOR DE CORRIDA:

##### Solución stock 10 X para 4 litros:

En un matraz aforado de 1000 ml, colocar 120 g de Tris Base, 576 g de Glicina y 40 g de SDS, mezclar con aprox. 600 ml de agua desionizada y aforar con el mismo solvente. pH aprox. 8.4.

### APENDICE VII

##### Teñido y desteñido de los geles de SDS-PAGE:

La tinción se realizó, dejando los geles dentro de un recipiente tapado y cubiertos con solución de metanol-ácido acético durante toda la noche, posteriormente se destiñeron con otra solución de metanol y ácido acético.

APENDICE VIII:

Preparación de soluciones para la electroforesis en doble dimensión (O'Farrell):

NOTA: Usar Urea, Acrilamida y Bisacrilamida recristalizadas.

Soluciones:

<b>A</b>	<u>Amortiguador de Lisis</u>	Para 10 ml
	9.5 M Urea	5.7 g
	2 % (p/v)	0.2 ml
	1.6 % Anfolinas 5-7 pH	160 $\mu$ l
	0.4 % Anfolinas 3-10 pH	40 $\mu$ l
	5.0 % $\beta$ -mercaptoetanol	500 $\mu$ l

Filtrar a través de un filtro Millipore de 0.22  $\mu$ m y guardar en alícuotas congeladas.

<b>D</b>	<u>Solución D</u>	Para 100 ml
	28.38 % Acrilamida (p/v)	28.38 g
	1.62 % Bisacrilamida (p/v)	1.62 g

Filtrar y guardar a 4°C.

<b>E</b>	<u>Solución E</u>
	10 % v/v Nonident p-40 en H <sub>2</sub> O

<b>I</b>	<u>Amortiguador del ánodo</u>
	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0.01 M

<b>J</b>	<u>Amortiguador del cátodo</u>
----------	--------------------------------

NaOH 0.02 M (0.8 g/l) (Desgasificar exhaustivamente).

<b>K</b>	<u>Solución K</u>	Para 10 ml
	9.5 M Urea	5.4 g
	0.8 % Anfolinas 5-7 pH	80 $\mu$ l
	0.2 % Anfolinas 3-10 pH	20 $\mu$ l

Filtrar y guardar en alícuotas congeladas

<b>O</b>	<u>Amortiguador O</u>	
	10 % Glicerol	100 ml
	5 % $\beta$ -mercaptoetanol	10 ml
	2.3 % SDS	9.2 ml (SDS 25 %)
	0.0625 M Tris-HCl pH 6.8	6.25 ml (Tris 1M pH 6.8)

Filtrar.

**P**     Solución P

1 g de agarosa  
100 ml amortiguador G  
20 mg de azul de bromofenol

Guardar a 4°C.

**APENDICE IX:**

Preparación de soluciones para el "Rocket" inmuno-electroforesis:

Solución de Boratos 0.1 M pH 8.6:

Disolver 9.276 g de ácido bórico en 1000 ml de agua bidestilada, ajustar el pH a 8.6 con NaOH 1 M y aforar a 1500 ml. Almacenar en una botella de polipropileno de 2000 ml a 4°C.

Preparación de la solución de azul de Bromofenol 10 x:

Disolver 1.0 g de azul de bromofenol en 10 ml de solución de boratos 0.1 M pH 8.6. Almacenar en un vial de vidrio con tapón de rosca a temperatura ambiente.

Azul de Coomassie al 0.5 %:

Mezclar 1.0 g de azul de coomassie brillante R-250 en 90 ml de etanol, 20 ml de ácido acético glacial y 90 ml de agua, con agitación constante. Filtrar a través de papel Whatman No. 1 Almacenar en una botella de polipropileno de 250 ml a temperatura ambiente.

Solución desteñidora:

Mezclar 90 ml de agua, 20 ml de ácido acético glacial y 90 ml. de etanol en la campana extractora. Almacenar a temperatura ambiente en una botella de polipropileno de 250 ml con 1/3 de carbón activado.

NaCl 0.1 N:

Disolver 2.92 g de NaCl en 200 ml de agua bidestilada y aforar a 500 ml. Almacenar a 4°C en una botella de polipropileno de 500 ml.

Preparación de agarosa al 1.5 %:

Mezclar 0.45 g de agarosa tipo II Sigma No. Cat. A6877, con 30 ml de amortiguador de boratos 0.1 M, pH 8.6 en un vaso de precipitados de 40 ml. Fundir la mezcla en un horno de microondas con tres o cuatro periodos de irradiación a máxima intensidad durante 10 segundos cada vez, sin dejar que llegue a ebullición. Agitar con una varilla de vidrio delgada hasta que quede un fluido cristalino. Mantener la agarosa fundida tapada en un baño a 57°C para evitar su gelificación.

APENDICE X.

Preparación de la solución de yodo-yoduro para placas de agar  
almidón:

Disolver 1.0 g de yodo y 3.0 g de yoduro de potasio en 50 ml de agua bidestilada.

## V. RESULTADOS Y DISCUSION

### V.1 SISTEMA DE EMBRIOGENESIS SOMATICA DE LA ALFALFA *in vitro*

La obtención de embriones somáticos (ES), a partir de peciolas de plantas de alfalfa A7034 cultivadas en condiciones de invernadero, resultó ser satisfactoria con el método de desinfección utilizado, ya que se obtuvo una rápida generación de ES con índices altos de respuesta (hasta 88 %) y rendimiento (hasta 27 embriones/callos), e índices bajos de contaminación.

Nuestros resultados además confirman los de trabajos anteriores realizados por otros investigadores, quienes refirieron tiempos de cultivo cortos y reproducibles para la embriogénesis somática en alfalfa (Villegas, 1988; Peña, 1989).

Los índices de respuesta obtenidos en el presente trabajo con ésta variedad fueron de 79.86 %  $\pm$  8.07 %, en un promedio de 12 siembras en condiciones de cultivo basales realizadas antes de iniciar la fase experimental. El objetivo de éstos ensayos fue establecer las condiciones de cultivo estándar y los resultados factibles a obtener con éstas condiciones.

Los resultados de éstas siembras, nos indican que contamos con índices de respuesta altos (desde 70 % hasta 88 % aprox.). Sin embargo durante la fase experimental, se tuvo una variación en la respuesta de los lotes control de entre 56 a 88 % de callos con embriones, lo que nos hace considerar que este es un parámetro sensible a los cambios en las condiciones de cultivo. Así como un buen indicador en la evaluación de las ventajas y desventajas de los diferentes tratamientos probados en los experimentos de manipulaciones de medio.

En el caso de las variaciones observadas en la respuesta de los lotes control utilizados durante los experimentos, cabe señalar que las condiciones de cultivo no fueron exactamente las mismas durante todo el período de trabajo experimental ya que se detectaron algunas variaciones de temperatura importantes en el cuarto de cultivo durante las diferentes estaciones del año. Sin embargo, éstas variaciones de temperatura no pudieron ser controladas totalmente, dadas las condiciones de las instalaciones en las que se trabajó.

Por otro lado, nosotros consideramos que la variación en los índices de respuesta es también determinada por la variabilidad intrínseca del tejido; éste factor es muy importante de ser considerado ya que no es totalmente controlable, sobre todo cuando se está trabajando con explantes extraídos de plantas obtenidas después de uno o

dos ciclos de recurrencia por lo menos, como fue en nuestro caso.

Los ciclos de recurrencia, se refieren a que se está partiendo de plantas de alfalfa obtenidas de ES, los cuales a su vez han sido obtenidos de plantas generadas por otros ES o a partir de una planta obtenida de la germinación de una semilla. Los resultados después de 2 ó 3 ciclos de recurrencia demuestran un incremento en la capacidad embriogénica o generación de un mayor número de embriones por explante; esto nos haría pensar que quizá fuera más conveniente utilizar plantas obtenidas a partir de varios ciclos de recurrencia y tener respuestas máximas. Sin embargo esto no es recomendado por la literatura ni por la experiencia ya que después de varios ciclos de recurrencia la capacidad de generar embriones se pierde totalmente. Este fenómeno es interpretado por algunos autores como un empobrecimiento de la capacidad embriogénica de estas plantas, sustentada por un cambio en su variabilidad genética.

Los índices de rendimiento alcanzados con el sistema de embriogénesis somática en alfalfa A7034 en condiciones basales, fueron aproximadamente de 21 embriones/callos en un promedio de 12 siembras, obteniéndose una variación de  $\pm 3$  embriones por callos, lo que indica que el comportamiento del parámetro es reproducible y muy satisfactorio. El conteo de éstos embriones estuvo basado exclusivamente en los ES más desarrollados, desde estadio torpedo joven hasta cotiledonar.

El rendimiento está relacionado con la respuesta, sin embargo en callos ubicados en un mismo frasco de cultivo podían encontrarse callos con 2 ó 3 embriones, en tanto que el callos vecino presentaba de 20 a 25 embriones. La formación diferencial de embriones en tales casos puede tener varias causas, como el grado de exposición y orientación de los embriones a la fuente de luz, a la región del callos donde son generados, al grado de inmersión de éste en el medio cultivo, etc. Sin embargo nosotros no realizamos ensayos para establecer si alguna de éstas causas era determinante en nuestros cultivos aunque consideramos que la variabilidad intrínseca del tejido es un factor muy importante. Los rendimientos en nuestro sistema fueron satisfactorios y además en algunos casos pudo presentarse la generación secundaria de ES, lo que incrementó aún más los índices de rendimiento.

Si bien los niveles de rendimiento alcanzados son satisfactorios, se utilizaron algunas estrategias para incrementar aún más los rendimientos de los cultivos de embriogénesis somática primaria. Esto se realizó durante las fases de resiembra; esto es, en la transferencia de los callos de la fase de inducción a la fase de desarrollo y durante la transferencia de los callos del medio de

desarrollo al medio de germinación. En el primero se disgregaba suavemente el friable tejido caloso, con ayuda de una espátula incrementando la superficie de callo en contacto con el medio de cultivo, lo que redundaba en una mayor producción de embriones. Asimismo, durante la transferencia en condiciones asépticas de la fase de desarrollo a la de germinación, se tomaban sólo los embriones maduros y los demás, que generalmente se encontraban en un estado de desarrollo menos avanzado, se dejaban continuar en desarrollo. Una vez que éstos maduraban, eran transferidos al medio de germinación, en éstos casos era posible transferir embriones de un mismo callo, hasta tres veces, obteniendo un total de embriones para germinación de por lo menos 35 embriones por callo.

La tabla con los resultados obtenidos para los cultivos en condiciones basales, se muestra a continuación:

SIEMBRA	RESPUESTA (%)	RENDIMIENTO (%)
1	82.7	20
2	56.0	22
3	81.5	22
4	73.2	19
5	85.9	18
6	82.6	20
7	79.5	27
8	88.6	23
9	84.3	18
10	81.7	17
11	83.4	20
12	78.9	23
PROMEDIO	79.858	21
DESV. ST.	8.069	3

Fig. No. 4. Resultados de respuesta y rendimiento para 12 lotes de callos de alfalfa, cultivados en condiciones basales durante el desarrollo embriogénico in vitro.

El tiempo de obtención de ES es variable, sin embargo a los 36 días de cultivo se cuenta ya con aproximadamente un 36 % de embriones en estadio de torpedo maduro y aproximadamente un 40 % de embriones en estadio cotiledonar, ambos son susceptibles de germinar normalmente por lo menos en un 50 %.

En cuanto a la heterogeneidad del cultivo, ésta estuvo siempre presente, observándose la presencia de diferentes estadios de desarrollo a un mismo tiempo de cultivo en la misma población de callos, en este sentido se consideraron

diferentes factores involucrados, tales como la variabilidad intrínseca del tejido utilizado, la superficie del callo en contacto con el medio de cultivo, la cercanía de los frascos a la fuente de luz, etc., siendo el primero de éstos quizá el más importante.

Las características morfológicas de los ES en estadios de desarrollo avanzados como el cotiledonar tardío, involucran la presencia y/o desarrollo de raíces, Así como el crecimiento evidente de los cotiledones. Sin embargo el desarrollo radicular en el medio de germinación fue más bien pobre y en condiciones basales no se obtuvo un desarrollo vigoroso que permitiera el mantenimiento de las plántulas durante largo tiempo. En general solamente el 10 % de las plantas germinadas in vitro, alcanza a desarrollarse en tierra hasta los 50 cm de altura, después de aproximadamente 6 meses de cultivo.

Los porcentajes de germinación en los ES fueron altos al inicio del cultivo. Para las 12 siembras realizadas se obtuvo un índice promedio de 58.6 %  $\pm$  6.49 % a los 15 días, sin embargo, este porcentaje se redujo a 29.42 %  $\pm$  7.94 % después de 30 días.

Los resultados son los siguientes:

SIEMBRA	GERMINACION 15 DIAS (%)	GERMINACION 30 DIAS (%)
1	59	32
2	60	33
3	58	22
4	71	42
5	66	35
6	52	36
7	63	40
8	59	29
9	60	26
10	52	18
11	45	17
12	58	23
PROMEDIO	58.58	29.42
DESV. ST.	6.49	7.94

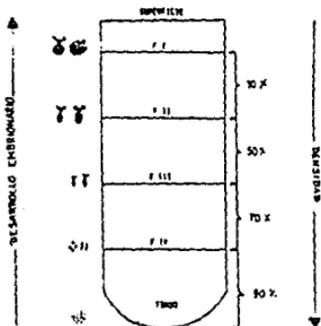
Fig. No. 5. Resultados de germinación (%), a los 15 y 30 días, después de transferir a medio de germinación, para 12 lotes de callos de alfalfa, cultivados en condiciones basales durante el desarrollo embrionógico in vitro.

El desarrollo de éstas plantas en condiciones de invernadero, es lento y requiere de cuidados, sin embargo una vez establecida, la plántula puede llegar inclusive a floración normal.

## V.2. SEPARACION DE EMBRIONES SOMATICOS POR CENTRIFUGACION EN GRADIENTES DE DENSIDAD DISCONTINUA DE SACAROSA.

Dado que se trabajó con grupos de ES en todos los estadios de desarrollo y no era confiable atribuir los resultados obtenidos a algún estadio en particular, se planteó la necesidad de separar los diferentes estadios embrionarios, con el fin de hacer una evaluación más precisa y confiable de su contenido de proteínas. Se propuso la utilización de gradientes de densidad discontinua de sacarosa en los cuales se colocaron los ES cosachados y fueron centrifugados y ubicados dentro del gradiente de acuerdo a su densidad específica.

Para esto, se realizaron algunos ensayos con el objetivo de determinar cuales eran las concentraciones de sacarosa óptimas para una buena separación de los embriones, se encontró que éstas fueron las siguientes: soluciones acuosas de sacarosa al 90 ‰, 70 ‰, 50 ‰ y 30 ‰ p/v.



Se encontró además que los embriones van disminuyendo su densidad específica a medida que su desarrollo embrionario continúa; esto es esquematizado en la presente figura. La utilidad de éste método de separación, demostró ser muy importante, ya que la separación lograda en los gradientes fue clara y precisa y también resultó ser un método sencillo que separa de manera confiable los embriones cuya condición fisiológica es diferente aun cuando su tamaño puede ser el mismo.

Fig. No. 6. Gradiente de densidad discontinua de sacarosa, donde se indica la relación entre la concentración de sacarosa y los diferentes estadios de desarrollo embrionario.

### V.3. REPRODUCIBILIDAD DEL METODO DE EXTRACCION DE PROTEINAS DE RESERVA EN SEMILLAS Y EMBRIONES SOMATICOS DE ALFALFA.

Se obtuvo la reproducibilidad del método de extracción de las proteínas de reserva presentes en semillas de alfalfa el cual fue eficiente y selectivo como se observa en los geles de SDS-PAGE. Las extracciones fueron realizadas con diferentes cantidades de semillas completas o pulverizadas con nitrógeno líquido, obteniéndose los resultados mostrados en la figura No. 7.

Los pesos de semillas utilizados fueron seleccionados considerando que el mismo método de extracción sería empleado para los ES y que estos estarían disponibles en cantidades muy pequeñas.

Cabe señalar que se utilizaron dos lotes diferentes de semillas de alfalfa enviadas de Canadá, con las cuales se obtuvieron resultados diferentes. Con el primer lote, se iniciaron los experimentos de extracción y caracterización de proteínas, siendo los resultados muy satisfactorios, sobre todo en cuanto a los valores obtenidos para la relación Álbuminas/globulinas y a la limpieza de los patrones polipeptídicos encontrados. Una vez agotado el primer lote, se continuó el trabajo con un segundo lote con el que se obtuvieron variaciones en los resultados que demostraron un mayor contenido de álbuminas que de globulinas en éstas semillas, por lo que la relación A/G se incrementó. Asimismo, encontramos una mayor contaminación de bandas de alto peso molecular en los patrones polipeptídicos de las proteínas 7S y 11S, que no se presentaron con el primer lote como se muestra en la figura No. 8.

Las diferencias en los niveles de albúminas y globulinas, se señalan en la figura No. 7, en la cual, podemos observar que para el primer lote de semillas, se obtuvieron relaciones de albúminas vs. globulinas con un promedio de 1.80 para muestras de 100 mg y para el segundo el promedio fue de 3.36, también en muestras de 100 mg.

En esta figura se observan importantes diferencias en los valores obtenidos para cada ensayo, ya que se observa que el mayor contenido de albúminas (en mg de prot./g de tejido), se encontró en las extracciones del 2do. lote con 200 y 300 mg de semilla (aprox. 180 mg prot./g de tejido), en tanto que el contenido de globulinas se mantuvo muy similar en las extracciones del 2do. lote (aprox. 3.60 mg prot./g de tejido), de esta manera hubo una notable diferencia en la relación A/G, debida principalmente a las diferentes concentraciones de albúminas extraídas, las cuales también fueron irregulares, sobre todo en los lotes de semilla de 50 y 100 mg. Este efecto puede deberse a que se trabajó con cantidades y volúmenes mínimos por lo que cualquier pérdida de material que quedara adherido en las paredes de los viales

LOTE DE SEMILLAS (mg)	ALBUMINAS (mg prot./g te.)	GLOBULINAS (mg prot./g te.)	REL. A/V
50 mg	180.66 126.34	36.68 34.84	4.93 3.63
Promedio	153.50	35.76	4.28
Desv. st.	38.41	1.30	0.92
100 mg (1er. lote)	73.39 73.70 72.91 71.63	41.62 38.30 39.80 39.49	1.76 1.77 1.83 1.81
Promedio	72.91	39.80	1.80
Desv. st.	0.91	1.37	0.03
100 mg (2do. lote)	142.16 142.16 142.16 147.38 143.24 146.81	43.80 43.80 43.80 45.09 42.78 41.92	3.31 3.31 3.31 3.27 3.35 3.50
Promedio	143.98	43.53	3.36
Desv. st.	2.45	1.08	0.10
200 mg	183.81 183.81 183.81 181.64 195.88 190.12 189.20 147.36 191.58 182.65 189.85 190.65	53.22 53.22 53.22 48.01 47.94 47.79 48.20 34.39 47.79 40.15 35.13 37.45	3.45 3.45 3.45 3.78 4.09 3.98 3.93 4.29 4.01 4.55 5.40 5.09
Promedio	187.54	46.56	4.11
Desv. st.	4.59	6.31	0.66
300 mg	182.62 155.36	54.79 39.45	3.33 3.94
Promedio	168.99	47.12	3.63
Desv. st.	19.28	10.05	0.43

Fig. No. 7. Niveles de albúminas y globulinas expresados en mg de proteína/g de tejido obtenidos en extracciones sucesivas de semillas de alfalfa, utilizando 50, 100, 200 y 300 mg. En esta tabla también se muestra la relación albúminas/globulinas obtenida en cada una de estas extracciones, así como el promedio y desviación estándar de los datos obtenidos.

y tubos o por salpicaduras, tenía un efecto importantísimo en la cantidad final de proteína obtenida. Es evidente también que este efecto disminuye a medida que se incrementa la cantidad de semilla utilizada.

Si bien hay diferencias evidentes en los niveles de proteínas, consideramos que éstas son justificables y que además entre los ensayos se puede apreciar cierta regularidad en los resultados.

Una vez validado el método de extracción en la semilla, se procedió a su utilización con las muestras de ES.

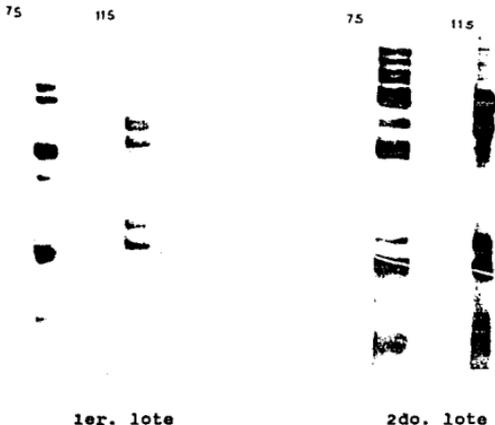


Fig. No. 8. patrones polipeptídicos de las globulinas extraídas de semillas de alfalfa obtenidas de dos lotes de semilla diferentes.

La extracción diferencial de las proteínas 7 S y 11 S, se realizó a partir de la fracción extraída de globulinas y en el caso de la proteína 11 S no hubo ningún problema ya que el método utilizado es específico, pues involucra una precipitación isoelectrica con amortiguador de acetatos pH 4.75, con el que se obtienen patrones polipeptídicos muy limpios. Sin embargo en el caso de la 7 S, se presentaron algunos problemas, pues como ya se mencionó, en el primer lote de semilla se obtuvieron patrones polipeptídicos muy claros y limpios y en el segundo lote se presentó una gran contaminación de bandas de alto peso molecular, así como de algunas que son específicas de la 11 S. Este problema se

resolvió parcialmente al realizar múltiples diálisis del sobrenadante de la fracción de globulinas después de la extracción de la 11 S, contra el amortiguador de acetatos pH 4.75 que precipita a la 11 S y deja en el sobrenadante a la 7 S, ésta última es separada por insolubilidad mediante precipitación por diálisis contra agua.

La separación de alícuotas durante la extracción fue obtenida a partir del homogenado total, de las diferentes fracciones de albúminas (1a, 2a y 3a), de las diferentes fracciones de globulinas (1a, 2a y 3a), de las fracciones de prolaminas y glutelinas (en los casos en que se realizó la extracción completa de proteínas), de proteína residual y del botón. Todas estas fracciones, también fueron cuantificadas también mediante Bradford.

En los casos en los que se realizó la extracción completa, se tomaron muestras del homogenado, de las fracciones de albúminas, globulinas y de la fracción del botón.

#### V.4. CUANTIFICACION DE PROTEINAS.

Con relación a la cuantificación, podemos mencionar que el método de Bradford fue inicialmente elegido porque es un método utilizado por varios autores para la cuantificación de globulinas de semillas y embriones cigóticos de leguminosas (Crouch, 1982; Crouch y Finkelstein, 1984), y porque es un método que no cuantifica proteína mediante la presencia de grupos aromáticos como el de Lowry, sino mediante la presencia de grupos amino y por lo tanto es más preciso y confiable.

Sin embargo, con el fin de demostrar que realmente era el método más útil para nuestro trabajo se realizaron ensayos en los que se demostró la linealidad de la absorbancia vs. la cantidad de proteínas.

Se hizo la preparación por duplicado de soluciones de proteínas de reserva a concentraciones conocidas de 10, 20, 30, 40 y 50  $\mu\text{g/ml}$ , las cuales fueron cuantificadas por el método de Bradford y el de Lowry. Con éste ensayo, se demostró que el comportamiento de la absorbancia era lineal y con una correlación de 0.9986 para la 11 S y de 0.992 para la 7 S siguiendo el método de Bradford. En contraposición, utilizando el método de Lowry se encontró un comportamiento no muy lineal para la 11 S, con una correlación de 0.986 y prácticamente no lineal para la 7 S, con la cual se obtuvo una correlación de 0.9008. Las gráficas que muestran los resultados de este experimento se muestran en la figura 9.

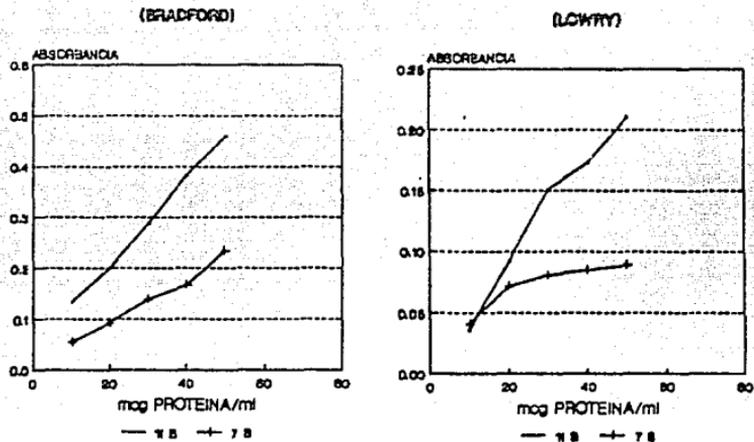


Fig. No. 9. Linealidad de los métodos de cuantificación de proteína Bradford y Lowry empleados para la fracción de globulinas de semillas de alfalfa.

Mediante este ensayo, se demostró que el comportamiento de la curva en la región de las concentraciones a analizar fue más lineal con el método de Bradford que con el de Lowry.

#### V.5. CARACTERIZACION DE LAS PROTEINAS DE RESERVA EN SEMILLAS Y EMBRIONES SOMATICOS DE ALFALFA.

Uno de los objetivos más importantes de este trabajo fue el de monitorear la presencia y actividades de síntesis y degradación de las principales proteínas de reserva en ES de alfalfa. Estas proteínas como ya se mencionó, pertenecen a la familia de las globulinas y ya han sido bioquímicamente caracterizadas en un gran número de especies de leguminosas. Dos puntos básicos de esta primera parte experimental y cuyos resultados ya fueron mostrados fueron:

- Demostrar que las proteínas de reserva que se presentan en los ES, son las mismas que las que se encuentran en la semilla.

- Que el método de extracción fuera reproducible y,

- Que el método de cuantificación de éstas proteínas fuera el más adecuado.

Otro punto importante fue:

- Demostrar que las proteínas de reserva que se presentan en los ES, son las mismas que las que se encuentran en la semilla, para lo cual se utilizó la caracterización electroforética e inmunolectroforética (Rocket), de las proteínas que correspondieron a los patrones establecidos para las globulinas cuyo coeficiente de sedimentación era 7S y 11S.

Para todas las muestras de albúminas y globulinas, se realizó el análisis electroforético de las diferentes fracciones muestradas mediante electroforesis en SDS-PAGE, por isolectroenfoque y por electroforesis en doble dimensión (O'Farrell).

#### V.5.1. ELECTROFORESIS EN SDS-PAGE:

Mediante este análisis se pudo apreciar la diferente composición de todas las fracciones proteicas y sus patrones característicos en los que también se apreciaron los cambios mencionados entre los dos lotes de semilla utilizados.

En los geles puede observarse que las fracciones de glutelinas y prolaminas son muy pobres en cantidad y componentes proteicos comparados con las albúminas y globulinas. Los resultados de estos ensayos también demuestran que en el botón queda una cantidad importante de proteínas que parecen corresponder a la 11 S (ver figura 10).



Fig. No. 10. Patrones electroforéticos de las diferentes fracciones proteicas obtenidas de semillas de alfalfa. Albúminas (Carriles 2 a 4) Globulinas (5 y 6), 7S s/DTT (7), 7S c/ DTT (8 y 11), 11 S s/DTT (9), 11 S c/DTT (10), Glutelinas (12), Prolaminas (13)

La caracterización de las proteínas de reserva en los embriones sexuales se realizó determinando los patrones polipeptídicos de estas proteínas mediante densitogramas y por cálculo directo de las distancias de migración con relación a los marcadores de bajo peso molecular tratados en condiciones reductoras al igual que las muestras.

Para determinar estos patrones polipeptídicos, se hizo un ajuste por regresión lineal de las distancias promedio de los marcadores de bajo peso molecular vs. el log de su peso molecular correspondiente, como se muestra en la figura 11.

P.M. (kD)	SEMILLA (GELES DE 14 X16)		EMBRIONES SOMATICOS (MINIGELES)	
	Dist. prom. (mm)	Desv. st. (mm)	Dist. prom. (mm)	Desv. st. (mm)
92.5	17.17	3.92	13.18	2.69
66.2	30.50	7.28	21.714	5.91
45.0	44.08	3.77	31.68	8.50
31.0	59.43	7.63	46.86	8.22
21.5	77.50	13.17	56.86	4.48
14.4	96.75	5.51	68.214	3.51

Fig. No. 11. Distancias promedio de los diferentes marcadores de peso molecular empleados para los ensayos de caracterización de las proteínas de reserva tanto en extractos de semillas geles de (14 x 16), como de ES (minigeles).

El análisis de regresión lineal fueron obtenidos con el logaritmo en base 10 del peso molecular de cada marcador; estos datos se muestran a continuación:

PESO MOLECULAR (kD)	log P.M.
92.5	4.966
66.2	4.821
45.0	4.653
31.0	4.491
21.5	4.332
14.4	4.158

Los resultados de la regresión lineal fueron los siguientes:

	SEMILLA	EMBRIONES SOMATICOS
PENDIENTE	- 95.1869	- 69.8416
ORDENADA	489.734	358.94
I. CORRELACION	0.99632	0.99789

Una vez definida la ecuación de la recta para cada gel en particular, se determinó el peso molecular de cada banda en el gel mediante la siguiente formula:

$$\text{Peso molecular} = \text{antilog} \frac{\text{DM} - b}{m}$$

donde:

DM = Distancia migrada en el gel por cada banda de la muestra.

b = Ordenada al origen.

m = Pendiente de la recta.

Cabe señalar que este cálculo se realizó de manera particular para cada gel, considerando en cada caso sus respectivos marcadores de peso molecular con el fin de evitar alteración de los resultados por la variación de las condiciones de corrida electroforética intrínsecas de cada ensayo.

La comparación de los patrones polipeptídicos de la proteína 11 S, se realizó sobre un promedio de 26 geles de SDS-PAGE, y sobre un promedio de 23 geles de SDS-PAGE para la 7S.

Los resultados de este análisis para las proteínas de reserva de las semillas condujeron a los patrones característicos señalados en las figuras 12, 13, 14 y 15.

En estas figuras se muestran los patrones característicos de las globulinas de semillas y de las proteínas 7S y 11S que nosotros encontramos, además estos patrones son comparados con los encontrados por otros autores para la alfalfa y los de otras especies de leguminosas. En esta tabla se observa que hay una gran similitud entre lo reportado en la literatura con nuestros resultados, lo que indica que el método de extracción y de análisis

	P. M.	ALBUMINAS SEMILLA	GLOBULINAS SEMILLA	11 S SEMILLA	Stuart 1985	11 S Krochko
	100	100				
	90		96, 94 (D) 90	89		
	80		83, 82, 81 (T)			
	70		78	78, 75 (D) 71		
	60	69 64 59 57 53	68 60(D) 57, 56, 54	64, 66 60, 63 56		
	50	48 44	48 (D) 44, 42, 41	47, 49 42, 45 40, 41	47 (T) 42 40	49
	40	38	35 (D)	35, 37, 38 (T)		40
	30	32 25	32 30	32,33 (D)		
	20	19 16 14	22, 24 18, 19, 20 (T) 15, 16 13	27 23 19, 20 (D) 15, 16 13	22 20	23, 24 20
	10					
# BANDAS:		15	15	13	4	5
# BANDAS SIMILARES:				10	4	5
% SIMILITUD				66.60%	100%	100%

Fig. No. 12. Tabla comparativa en la que se muestran los valores de peso molecular de las diferentes bandas obtenidas por SDS-PAGE, para la globulina 11 S de semillas de alfalfa, comparadas con los valores de P. M. reportados por otros investigadores para estas proteínas. En esta tabla se indica además el número de bandas similares y el % de similitud entre estas fracciones y las obtenidas por los otros autores.

	P. M.	GLOBULINAS SEMILLA	GLOBULINAS EN VARIOS ESTADOS	7 S ES	7 S SEMILLA
	90	96, 94 (D) 90	89 85		86
	80	83-81 (T)			
	70	78	77		
	60	68	67, 69 66	69 64	
	50	60 (D) 57-54	58, 60 55-54	60 53	52
	40	48 (D) 44-41	48, 49 45-42	47	47, 49 45
	30	35 (D) 32, 30	38, 36 34-31 27	38 32, 31 25	39 32
	20	24, 22 20-18 (T) 16, 15	24, 22 20, 19 15	20	22 20
	10	13	13		
# BANDAS:		15	16	9	8

Fig. No. 13. Tabla comparativa de los valores de peso molecular de los polipéptidos componentes de las globulinas 7 S en embriones somáticos y semillas de alfalfa.

	P. M.	GLOBULINAS SEMILLA	GLOBULINAS EN VARIOS ESTADIOS	11 S ES	11 S SEMILLA
	90	96, 94 (D) 90	89 85		86
	80	83-81 (T)			
		78	77		
	70				
		68	67, 69 66	65	
	60	60 (D) 57-54	58, 60 55-54		
	50				52
		48 (D) 44-41	48, 49 45-42	49 45	47 (T)
	40			41	
			38, 36	38	39
	30	35 (D) 32, 30	34-31 27	32 27	36
	20	24, 22 20-18 (T)	24, 22 20, 19	23	22 20
		16, 15 13	15 13	16	
	10				
# BANDAS:		15	16	9	7

Fig. No. 14. Tabla comparativa de los valores de peso molecular de los polipéptidos componentes de las globulinas 11 S en embriones somáticos y semillas de alfalfa.

	GLOBULINAS ES	GLOBULINAS SEMILLA	7 S	11 S
7 S	57.14%	35.00%	76.92%	
11 S	33.30%	30.00%		69.23%

Fig. No. 15 Tabla comparativa de los % de similitud entre los patrones polipeptídicos obtenidos con los extractos de globulinas 7 S y 11 S de semillas y embriones somáticos de alfalfa.

De acuerdo a los resultados mostrados, las globulinas en los ES comparten alrededor de un 65 % de bandas con las globulinas de semilla y en el caso de las proteínas 11 S y 7 S, observamos que para la 11 S se comparte entre un 70 y 75 % de bandas y para la 7 S aproximadamente un 70 % con respecto a las 7 S y 11 S de semilla.

Cabe señalar que las primeras extracciones de ES fueron realizadas alrededor de la 5a. semana de cultivo y los extractos fueron obtenidos a partir de la población embrionaria completa encontrada, esto implica que se tomaron ES de todos los estadios de desarrollo presentes en el cultivo a este tiempo, lo que puede enmascarar un poco el contenido real de proteínas de reserva que se presentan solo en algunos estadios de desarrollo de los ES. Esto provocó también una gran heterogeneidad en la distribución de las bandas, ya que se encuentran en un solo carril todas las diversas formas de las proteínas que se suceden durante el desarrollo embrionario.

Estos resultados indican que los ES contienen éstas proteínas, sin embargo los patrones no son totalmente equivalentes ya que es posible que a este tiempo de cultivo las proteínas no estén totalmente conformadas y se encuentren subunidades o polipéptidos aún no integrados en las proteínas maduras, sino más bien en proceso de síntesis o agrupación.

De cualquier manera la correlación de las diferentes subunidades en los ES con las de la semilla es interesante y el análisis de su composición en los diferentes estadios de desarrollo se detalla en los resultados del experimento de cinética de desarrollo.

### V.5.2. ISOELECTROENFOQUE:

Los patrones de bandeado obtenidos para los extractos de globulinas 7 S y 11 S de semillas de alfalfa al ser analizados por isoelectroenfoque, demostraron que la proteína 7 S está constituida por 6 bandas principales cuyos puntos isoelectrónicos se ubican en un rango muy cercano, en tanto que la proteína 11 S, presenta alrededor de 10 bandas principales, 2 de las cuales se ubican en la región negativa del gradiente de punto isoelectrónico, en tanto que las demás se encuentran en la parte positiva del mismo, éstos resultados confirman los reportes de otros investigadores que mencionan que la proteína 11 S está constituida por dos subunidades principales, una ácida y otra básica.

Los resultados de nuestros ensayos se muestran en las Figs. No. 16 y 17.

### V.5.3. ELECTROFORESIS EN DOBLE DIMENSION (O'Farrell):

Este método que involucra la separación de los componentes proteicos de acuerdo a su punto isoelectrónico (1a. dimensión) y por su peso molecular (2da. dimensión), con ésta técnica se logró una mejor separación de las subunidades componentes de las proteínas de reserva y se demostró que las principales subunidades de ambas proteínas tienen un punto isoelectrónico diferente y por otro lado que el peso molecular de cada una de ellas es similar a los obtenidos en los geles de SDS-PAGE simples.

Los resultados obtenidos con esta técnica se muestran en las Figs. No. 18 y 19.

Los ensayos de isoelectroenfoque y electroforesis en doble dimensión no fueron realizados en los extractos de proteínas de ES sino sólo utilizados en la caracterización de las proteínas de reserva en las semillas al inicio de la presente investigación.

Una vez definida la presencia e identidad de las proteínas de reserva de la semilla y en los ES, nuestros esfuerzos se encaminaron a conocer cual era el cambio de los niveles de éstas proteínas de reserva durante el desarrollo de los ES, monitoreando los cambios en sus patrones polipeptídicos por electroforesis en SDS-PAGE en una dimensión, para éstos experimentos, se realizó una cinética de desarrollo que involucró un análisis completo de las características de los cultivos embriogénicos y de los ES, de los cuales se realizaron cosechas cada 3 días durante los 42 días totales de cultivo in vitro.

+

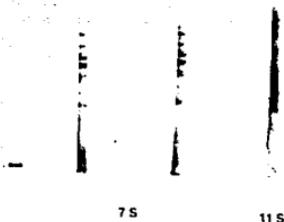


Fig. No. 17. Isoelectroenfoque de las proteínas 7 S y 11 S de semillas de alfalfa, realizado en tubo, se indican los extremos ácido y básico y se pueden apreciar claramente el número de polipéptidos componentes de diferente punto isoelectrónico.

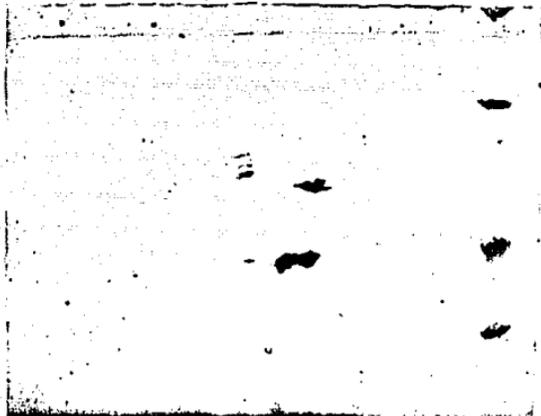


Fig. No. 18. Gel de electroforesis en doble dimensión (O'Farrell) correspondiente a la fracción 75, del extracto de globulinas de semillas de alfalfa.



Fig. No. 19. Gel de electroforesis en doble dimensión (O'Farrell) correspondiente a la fracción 115, del extracto de globulinas de semillas de alfalfa.

## V.6. CINETICA DE DESARROLLO EMBRIONARIO

### V.6.1. EVALUACION DE LAS CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DEL CULTIVO.

Como ya se mencionó, las cosechas fueron realizadas cada 3 días. La evaluación de las características morfológicas de los ES cultivados in vitro, estuvo de acuerdo a las detalladas anteriormente, pudiéndose observar todo el desarrollo desde la siembra del inóculo, hasta la formación, crecimiento y germinación de los ES.

En la alfalfa el desarrollo embrionario in vitro en condiciones de fotoperíodo se desarrolla de manera muy similar al caso de oscuridad, salvo que en éste último caso, los embriones obtenidos son blanquecinos y más bien redondeados, lo que representa un desarrollo cotiledonar más pobre que en el caso de fotoperíodo. A continuación se describe el desarrollo de los embriones en fotoperíodo.

DIA DE CULTIVO	MORFOLOGIA DE LOS CALLOS Y/O EMBRIONES
0	Pecíolo de color verde intenso, de consistencia dura y con una longitud aproximada de 8 mm.
3	Inóculo de color verde de consistencia dura, ligeramente deshidratado y con regiones de color blanco en las zonas de corte.
6	Inóculo de color verde mas intenso que muestra ligero abultamiento en la zona central y regiones de color amarillo claro en los bordes de las zonas de corte.
9	Inóculo de color verde muy intenso con notable abultamiento en el centro del mismo. En este tiempo se inicia la proliferación celular.
12	Inóculo de color verde, muy hinchado en la región central con alta proliferación celular en las zonas de corte o en regiones localizadas de ruptura del tejido, sobre todo en la región central del explante y en algunos casos en los extremos del inóculo. En la incipiente masa callosa se presentan grupos de células verdes y amarillas.

15 Inóculo con rápida proliferación celular y avanzada formación de callo, la pequeña masa callosa presenta un aspecto friable y color amarillo crema. Todavía hay grupos de células verdes. En algunos casos se observan algunos puntos pequeños de color verde claro y consistencia dura que corresponden a los primeros estadios de desarrollo de los ES.

18 Callo bien formado de color amarillo crema de aspecto friable, se continúan presentando grupos de células verdes. En esta etapa, son más evidentes y numerosos los precoces ES en desarrollo los cuales presentan un aspecto duro y un color verde claro. Así como una morfología más definida y característica de los estadios de globular y corazón.

En éste tiempo, se realiza la transferencia de los callos del medio de inducción (B<sub>5</sub> con reguladores de crecimiento), a medio de desarrollo (B<sub>5</sub> sin reguladores de crecimiento).

21 Callo completamente desarrollado, de aspecto friable y color amarillo claro que presenta una franca formación y proliferación de ES, los cuales se presentan inicialmente sólo en la superficie del callo, éstos ES son de una consistencia dura y color verde intenso. Generalmente se presentan en grupos.

En este momento se encuentran ya ES en los estadios de desarrollo de globular y corazón.

24 Callo completamente desarrollado de aspecto friable, consistencia suave y color amarillo claro con una gran cantidad de grupos ES en toda la superficie y algunos ES en estadio de torpedo desarrollados aisladamente.

El aspecto de éstos ES es bastante evidente, se presentan como estructuras con dos centros de crecimiento, uno basal y otro apical. Los ES son de color verde y consistencia dura.

- 27 Callo friable de color amarillo claro con una gran cantidad de ES en toda la superficie aérea del callo y en algunas cavidades del mismo. Los estadios de desarrollo de los ES presentes a éste tiempo de cultivo corresponden principalmente a los de globular y corazón, lo que indica que la fase de embriogénesis primaria continua.
- 30 Callo friable de color amarillo con gran proliferación de ES de color verde y consistencia dura, los cuales a partir de este tiempo inician su elongación. Los estadios de desarrollo presentes a este tiempo, corresponden a los estadios de torpedo tardío, torpedo maduro, torpedo joven y corazón - globular, siendo éstos dos últimos los predominantes. A partir de éste tiempo se pueden obtener ES susceptibles de germinar y generar plantas normales.
- 33 Callo friable de color amarillo con numerosos ES, de los cuales los principales estadios de desarrollo son los de torpedo maduro, torpedo tardío y corazón-globular que indican que a éste tiempo continúa la generación o formación de ES. Los ES en estadio de torpedo son grandes, de color verde y consistencia dura con el extremo apical separado en dos pequeños cotiledones.
- 36 Callo de color amarillo de apariencia friable cuyos ES a este tiempo corresponden a los estadios de desarrollo de torpedo tardío, torpedo maduro, torp. joven y corazón-globular, siendo otra vez, éstos dos últimos los predominantes. En los ES en estadios de torpedo se observa una mayor elongación y crecimiento de los cotiledones los cuales se separan y son cada vez más evidentes
- 39 Callo friable de color amarillo con ES en todos los estadios de desarrollo incluyendo el cotiledonar, casi en la misma proporción entre sí. En éstos estadios, los ES maduros presentan una clara separación de los cotiledones, los cuales se elongan y engrosan. La longitud y el volumen de los ES a éste tiempo son máximos. En algunos casos

puede observarse que en este momento, la casi totalidad de la población de ES corresponde al estadio cotiledonar, lo que indica el final de la fase de desarrollo embrionario; lo anterior puede ser debido a la variación en algunas condiciones ambientales como la temperatura.

42

Callo de color amarillo un poco deshidratado con ES en todos los estadios de desarrollo siendo predominante el estadio cotiledonar, los demás estadios se presentan en la misma proporción; se nota un incremento en la población de ES en estadio corazón-globular.

#### V.6.2. EVALUACION DE LA RESPUESTA EN LOS CULTIVOS DE EMBRIONES SOMATICOS.

Para determinar la cantidad de callos que presentaron formación de ES en cada cosecha de la cinética, se determinaron los mg de embriones en peso fresco del total de callos cosechados, de cuyo cociente se obtuvieron los mg de ES obtenidos por callo, de ésta manera se pudo apreciar si la capacidad embriogénica cambiaba con el tiempo y de que manera lo hacía.

Los resultados obtenidos con ES cultivados en medio de desarrollo basal y bajo condiciones de fotoperiodo y oscuridad a partir del día de cultivo 21 (que es cuando se presentan las poblaciones embrionarias), hasta el día de cultivo 42, se muestran en la figura No. 20.

Los resultados en esta figura, muestran de manera clara que a medida que el desarrollo avanza, la respuesta o capacidad embriogénica del cultivo se incrementa partiendo desde 10.1 mg de embriones /# de callos en el día 21 hasta 54.2 mg de embriones /# de callos en el día 39, éstos índices decaen un poco hacia el día de cultivo 42 (48.6 mg de embriones /# de callos) para el caso del cultivo en condiciones de fotoperiodo, lo que nos haría suponer que en la fase terminal del desarrollo la capacidad de generar embriones de los callos no se mantiene, sin embargo dada la heterogeneidad del cultivo y la particularidad de cada siembra, no podemos utilizar sólo estos datos para hacer ninguna aseveración y si remarcar la necesidad de más ensayos para demostrar si la tendencia sugerida es real o no.

Para los cultivos en oscuridad se observa un incremento similar en la respuesta que va desde 7.7 mg de embriones /# de callos en el día de cultivo 21 hasta 57.83 mg de embriones

/# de callos en el día de cultivo 36, sin embargo para el día 39 se observa una baja importante en la respuesta (38 mg de embriones /# de callos), que para el día 42 incrementa nuevamente a 51.1 mg de embriones /# de callos. Estos resultados en oscuridad indican lo contrario a los de fotoperiodo, ya que aparentemente en las fases terminales del desarrollo, la capacidad embriogénica se mantiene en niveles altos que sin embargo, pueden ser debidos a una nueva generación de embriogénesis somática.

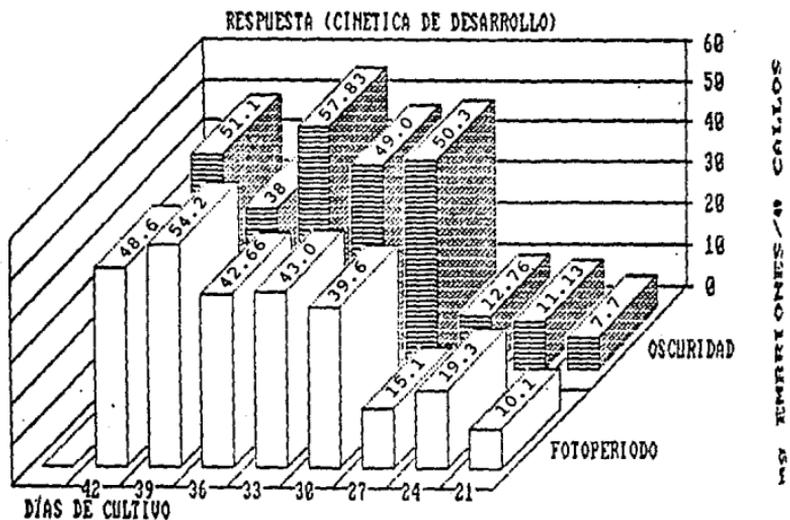


Figura No. 20. Respuesta de los cultivos de ES expresada en mg de embriones/# de callos para las cosechas del día de cultivo 21 al 42 en condiciones de fotoperiodo y oscuridad correspondientes al experimento de cinética de desarrollo.

### V.6.3. EVALUACION DE EL RENDIMIENTO EN LOS CULTIVOS DE EMBRIONES SOMATICOS.

Este importante parámetro indica el número de embriones por callo que se obtuvieron durante el cultivo in vitro y que fue determinado estimando el peso fresco en mg que aportan los ES por cada g de callo, siendo entonces sus unidades, mg de embriones/g de callo.

La evaluación del rendimiento se realizó en cada cosecha desde el día de cultivo 21 al 42, tanto para los lotes en condiciones de fotoperíodo como en oscuridad. Nuestros resultados se muestran en la figura No. 21.

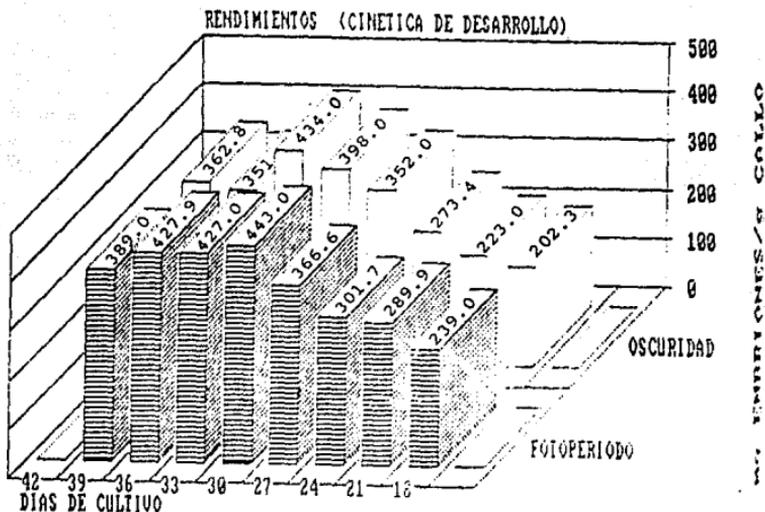


Fig. No. 21. Indices de rendimiento expresados en mg de embriones/g de callo de las cosechas de ES cultivados en condiciones de oscuridad y fotoperíodo desde día de cultivo 21 al 42.

Los resultados obtenidos para éste parámetro indican que el desarrollo embrionario continúa, la cantidad de ES formados incrementa yendo desde 239 mg de embriones/g de callo en el día de cultivo 21 hasta 443 mg de embriones/g de callo en el día 33, sin embargo se observa un ligero decaimiento en los niveles de rendimiento que llega hasta 389 mg de embriones/g de callo en el día de cultivo 42 en el caso del cultivo en condiciones de fotoperíodo. Para el caso del cultivo en oscuridad, se observa que el rendimiento sigue un comportamiento similar, iniciando en 202.3 mg de embriones/g de callo y alcanzando su máximo ligeramente después que en el caso de fotoperíodo ( 434 mg de embriones/g de callo en el día de cultivo 36), el posterior decaimiento en el rendimiento también se observa llegando a ser de 362.8 mg de embriones/g de callo para el día de cultivo 42.

Durante todo el desarrollo embrionario, se observa que los niveles de rendimiento son altos y que en general el periodo de cultivo de 33 a 42 días presenta un comportamiento regular.

#### V.6.4. EVALUACION DEL CRECIMIENTO EN LOS CULTIVOS DE EMBRIONES SOMATICOS.

El crecimiento de los cultivos en general entendido como el cambio en peso fresco de los callos fue evaluado mediante y expresado como los mg de callo con embriones/# de callo), éste parámetro indica el cambio en peso fresco de los callos con embriones, que pueden representar indirectamente la proliferación celular de los callos y el incremento en número y peso de los ES. Este parámetro al igual que los anteriores fue determinado en los callo obtenidos en las cosechas de ES cultivados en condiciones de fotoperiodo y oscuridad a partir del día de cultivo 12 (desde que la formación de callos es apreciable), hasta el día de cultivo 42 para el caso de los cultivos de fotoperiodo y del día de cultivo 21 al 42, para el caso del cultivo en oscuridad. (ver Fig. No. 22).

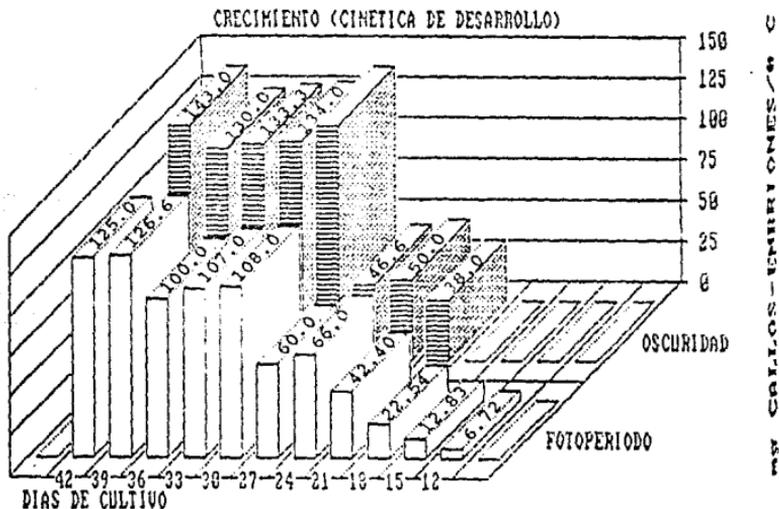


Fig. No. 22. Indices de crecimiento expresados en mg de callos con embriones/# de callo de las cosechas de ES cultivados en condiciones de oscuridad del día de cultivo 21 al 42 y en fotoperiodo del día de cultivo 12 al 42.

En el caso de éste parámetro se observa que los índices de crecimiento incrementan progresivamente con el desarrollo embrionario, sin embargo, se observa que para los cultivos en oscuridad, el crecimiento va desde 38.0 mg de callos con embriones/# de callo, hasta 143.0 mg de callos con embriones/# de callo para el día de cultivo 42, y en el caso de los cultivos de fotoperíodo va desde 6.72 mg de callos con embriones/# de callo en el día de cultivo 12 hasta 126.6 mg de callos con embriones/# de callo en el día de cultivo 39, es interesante notar que el crecimiento en los cultivos de oscuridad parece ser mayor que en los de fotoperíodo y que el incremento en los niveles de éste parámetro es súbito hacia el día de cultivo 30 y que después se mantiene en niveles altos de una manera regular ya que el incremento no es progresivo.

#### V.6.5. % EN PESO DE LAS DIFERENTES FRACCIONES EMBRIONARIAS

Se obtuvo la separación de las diferentes poblaciones embrionarias por centrifugación en gradientes de densidad discontinua de sacarosa, y cada una de las fracciones embrionarias fue pesada con el fin de determinar la proporción en peso fresco de cada una de ellas en el cultivo. De esta manera, se pudieron evaluar los cambios en la contribución en peso de los diferentes estadios de desarrollo durante el cultivo, desde el día 21 hasta el día 42, en las cosechas de los callos cultivados en condiciones de fotoperíodo y oscuridad. Los resultados obtenidos en cada una de estas cosechas son expresados en porcentaje y se muestran en las figuras 23 y 25 para fotoperíodo y en las 24 y 26 para oscuridad.

Días de cultivo	ESTADIO DE DESARROLLO				
	Cor-Glob (%)	Torp. j. (%)	Torp. m. (%)	Cot. j. (%)	Cot. (%)
21			49.0	31.73	
24		75.81		24.19	
27		73.86		26.14	
30	51.42	23.43	14.6	10.70	
33	48.26	7.66	13.95	25.57	
36	39.37	35.26	14.64	11.05	
39	23.95	14.45	20.63	17.72	25.38
42	37.67	16.09	13.62	15.45	17.18

Fig. No. 23. % de peso fresco de los diferentes estadios embrionarios obtenidos de los días de cultivo 21 al 42, durante la cinética de desarrollo en condiciones de fotoperíodo.

Días de cultivo	ESTADIO		DE DESARROLLO		
	Cor-Glob (%)	Torp. j. (%)	Torp. m. (%)	Cot. j. (%)	Cot. (%)
21			42.39	26.78	
24		66.60		33.40	
27		65.73		34.77	
30	24.77	14.87	15.37	28.88	
33	15.29	10.11	12.12	45.51	
36	28.94	8.44	8.13	40.7	
39	23.35	14.70	11.44	16.16	34.34
42	47.15	12.06	12.53	15.57	12.68

Fig. No. 24. % de peso fresco de los diferentes estadios embrionarios obtenidos de los días de cultivo 21 al 42, durante la cinética de desarrollo en condiciones de oscuridad.

**% EN PESO FRESCO DE LOS DIFERENTES ESTADIOS EMBRIONARIOS EN FOTOPERIODO**

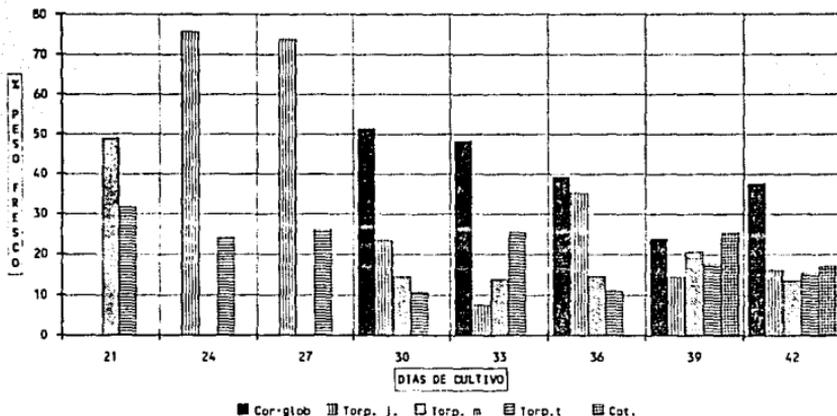


Fig. No. 25. % de peso fresco expresado en % de los diferentes estadios embrionarios de ES cultivados en medio de desarrollo basal del día de cultivo 21 al 42, en condiciones de fotoperiodo.

**‡ PESO FRESCO DE LOS DIFERENTES ESTADIOS  
EMBRIONARIO EN OSCURIDAD**

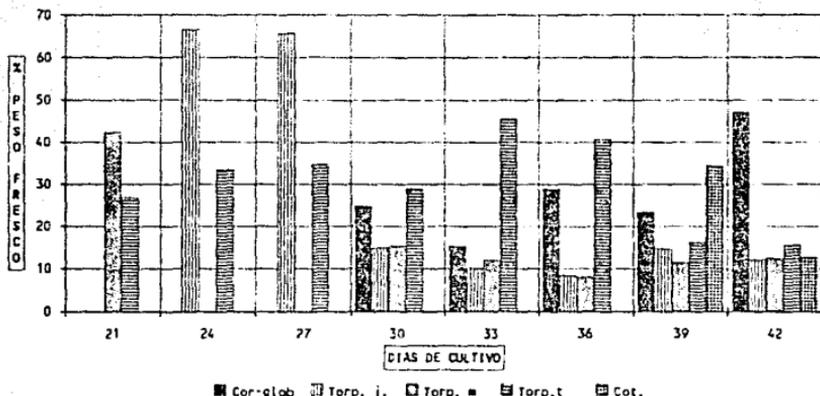


Fig. No. 25. ‡ de peso fresco expresado en ‡ de los diferentes estadios embrionarios de ES cultivados en medio de desarrollo basal del día de cultivo 21 al 42, en condiciones de fotoperíodo.

En las figuras mencionadas se observa que los estadios de desarrollo tempranos (cor-glob), se presentan como fracción importante hasta el día de cultivo 30, y que al inicio del desarrollo embrionario, se presentan estadios de desarrollo más avanzados, estos resultados pueden deberse a que durante la inducción se generan los ES y para la cosecha de 21 días estos se han desarrollado ya hasta los estadios de torpedo, por lo que las primeras poblaciones observadas en desarrollo son estas y no las de corazón. Se observa también que la heterogeneidad del cultivo se incrementa a medida que el desarrollo embrionario continúa y que las fracciones embrionarias predominantes son las de globular-corazón y torpedo de los días de cultivo 24 a 36. Así la formación y desarrollo masivo de los embriones se da en este periodo. Hacia el final del cultivo (días 39 y 42), se observa la presencia de embriones maduros en estadio cotiledonar en un porcentaje importante (25 a 34 %).

**V.6.6. CONTENIDO DE PROTEINAS EN LAS DIFERENTES FRACCIONES EMBRIONARIAS.**

Los resultados de la cuantificación de las fracciones de albúminas y globulinas en los extractos de peciolas y de las diferentes fracciones embrionarias para las cosechas desde 3 a 42 días en condiciones de fotoperíodo y de 21 a 42 días en condiciones de oscuridad se muestran a continuación:

En las figuras anteriores se observa que en el caso de fotoperíodo las albúminas (Fig. No. 31), incrementan fuertemente sus niveles a partir del día de cultivo 30 y alcanzan su máximo en el día de cultivo 36 en los estadios de corazón-globular (9.82 mg de proteína/g de tejido) y torpedo (22.44 mg de proteína/g de tejido), después de este día, inicia una baja en concentración que llega hasta 0.373 mg de proteína/g de tejido para la fracción de corazón-globular y 10.258 mg de proteína/g de tejido para la fracción de torpedo. En el caso de los embriones en estadio cotiledonar, sus niveles de albúminas inician siendo bajas en el día 33 (4.64 mg de proteína/g de tejido) e incrementan hasta 12.69 mg de proteína/g de tejido para el día de cultivo 42. De esta manera se observa que durante la fase media del desarrollo *in vitro* se da una alta síntesis de albúminas que probablemente se requieren para la maduración de los ES, los cuales en el estadio cotiledonar presentan un incremento en la concentración de estas proteínas que si bien es menor que en el caso de los embriones en estadio torpedo, muestran gran cantidad de albúminas que para este momento pueden no ser convenientes pues, podrían facilitar la degradación de otras estructuras o moléculas ya formadas como las globulinas.

En el caso del cultivo en oscuridad (Fig. No. 33), se observa un comportamiento muy similar al de fotoperíodo, observándose que en estas cosechas los niveles de albúminas incrementan también a partir del día de cultivo 30 y alcanzan su máximo para el día 36, pero en este caso las fracciones embrionarias que presentan gran cantidad de albúminas son la torpedo (18.28 mg de proteína/g de tejido) y la cotiledonar (15.282 mg de proteína/g de tejido en el día 33), después de lo cual se observa una baja en la concentración de las albúminas de ambas fracciones que llega a 13.042 mg de proteína/g de tejido en la torpedo y a 8.641 mg de proteína/g de tejido en la cotiledonar. De esta manera, parece que el desarrollo en oscuridad favorece un rápido desarrollo y maduración de los embriones y la formación de una gran cantidad de albúminas en estos, las cuales al final del cultivo también experimentan un descenso en su concentración que sin embargo no es tan importante como en el caso de fotoperíodo, en donde los niveles de albúminas son en general mayores que los de oscuridad.

En la cuantificación de las globulinas de los cultivos en fotoperíodo (Fig. No. 32), se observa que las concentraciones de estas proteínas inician un incremento importante en sus niveles en la fracción de torpedo desde el día de cultivo 27 (5.24 mg de proteína/g de tejido) y alcanzan su máximo en el día de cultivo 33 (7.585 mg de proteína/g de tejido) que después desciende hasta 4.314 mg de proteína/g de tejido en el día 42. Así el comportamiento de las globulinas es similar al de las albúminas, que alcanzan su máximo después de las primeras. El descenso en concentración de las globulinas puede también ser explicado

ALBUMINAS  
(mg de proteína/g de tejido)

FOTOPERIODO

DÍA	PECTOLO	CALLO	COR-GLOB	TORPEDO	COTILEDONAR
3	0.0489				
6	0.049				
9	0.049				
12	1.466				
15	1.465				
18	1.78				
21			1.14	1.6	
24			1.25	2.87	
27		0.269	1.84	3.53	
30		0.293	5.07	9.9	
33		0.32	6.96	13.82	4.64
36		0.35	9.62	22.44	5.22
39		0.215	2.76	11.71	7.9
42		0.13	0.37	10.26	12.7

Fig. No. 27. Niveles de albuminas de los extractos de los diferentes estadios de desarrollo de ES, cultivados en medio de desarrollo basal del día de cultivo 3 al 42, en condiciones de fotoperiodo.

GLOBULINAS  
(mg de proteína/g de tejido)

FOTOPERIODO

DÍA	PECTOLO	CALLO	COR-GLOB	TORPEDO	COTILEDONAR
3	0.035				
6	0.05				
9	0.051				
12	0.362				
15	0.324				
18	0.29				
21	0.26		0.17	0.83	
24			0.45	2.59	
27		0.044	1.16	5.24	
30		0.19	2.05	7.14	0.4
33		0.23	1.985	7.59	2.16
36		0.25	1.62	4.88	2.28
39		0.27	1.1	4.52	2.085
42		0.21	0.34	4.31	0.52

Fig. No. 28. Niveles de globulinas de los extractos de los diferentes estadios de desarrollo de ES, cultivados en medio de desarrollo basal del día de cultivo 3 al 42, en condiciones de fotoperiodo.

**ALBUMINAS**  
(mg de proteína/g de tejido)

**OSCURIDAD**

DIA	CALLO	COR-GLOB	TORPEDO	COTILEDONAR
21		2.71	1.98	
24		1.96	2.06	
27	0.25	2.47	3.61	
30	0.31	2.85	5.68	5.31
33	0.3	3.11	10.45	15.28
36	0.311	2.92	18.28	9.8
39	0.67	1.985	14.42	8.97
42	0.51	0.315	13.04	8.64

Fig. No. 29. Niveles de albúminas de los extractos de los diferentes estadios de desarrollo de ES, cultivados en medio de desarrollo basal del día de cultivo 21 al 42, en condiciones de oscuridad.

**GLOBULINAS**  
(mg de proteína/g de tejido)

**OSCURIDAD**

DIA	CALLO	COR-GLOB	TORPEDO	COTILEDONAR
21		0.6	0.57	
24		0.38	1.17	
27	0.031	0.41	2.98	0.41
30	0.041	0.57	3.84	1.63
33	0.104	0.845	4.98	3.83
36	0.09	1.22	4.62	3.66
39	0.05	1.55	4.15	3.5
42		0.2	1.7	1.28

Fig. No. 30. Niveles de globulinas de los extractos de los diferentes estadios de desarrollo de ES, cultivados en medio de desarrollo basal del día de cultivo 21 al 42, en condiciones de oscuridad.

### CINETICA DE ALBUMINAS FOTOPERIODO

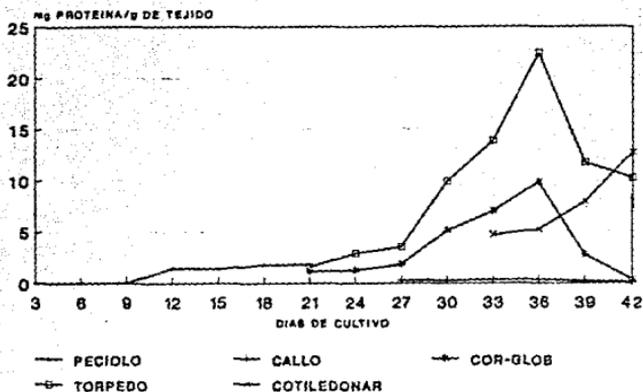


Fig. No. 31. Niveles de albúminas en ES cultivados en medio de desarrollo basal del día de cultivo 3 al 42, en condiciones de fotoperiodo.

### CINETICA DE GLOBULINAS FOTOPERIODO

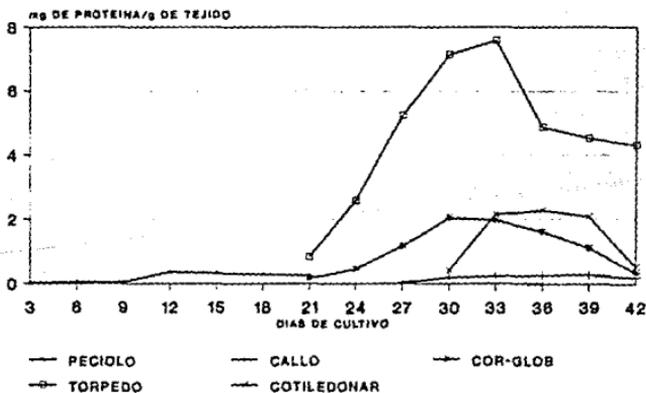


Fig. No. 32. Niveles de globulinas en ES cultivados en medio de desarrollo basal del día de cultivo 21 al 42, en condiciones de fotoperiodo.

### CINETICA DE ALBUMINAS OSCURIDAD

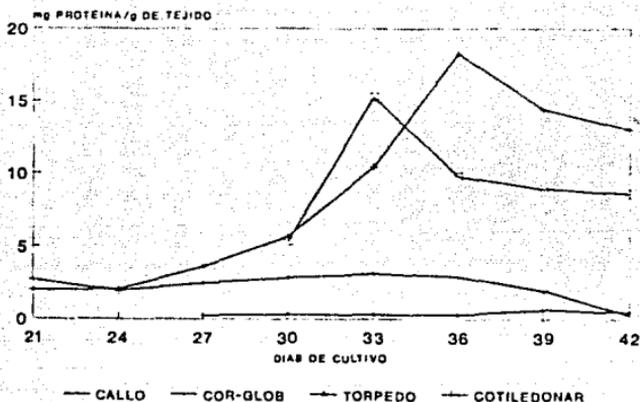


Fig. No. 33. Niveles de albúminas en ES cultivados en medio de desarrollo basal del día de cultivo 3 al 42, en condiciones de oscuridad.

### CINETICA DE GLOBULINAS OSCURIDAD

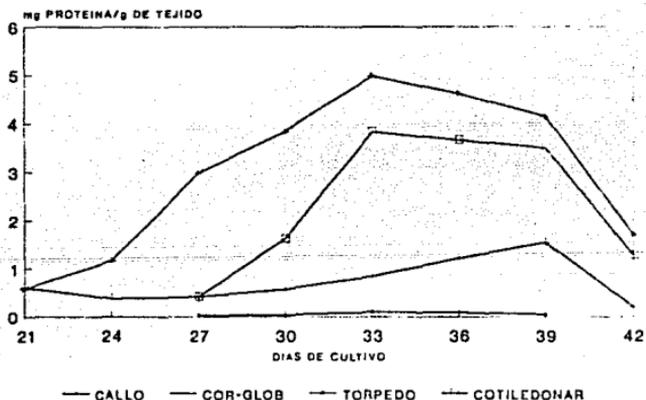


Fig. No. 34. Niveles de globulinas en ES cultivados en medio de desarrollo basal del día de cultivo 21 al 42, en condiciones de oscuridad.

por los altos niveles de albúminas presentes a este tiempo de cultivo y demuestra que hacia el final del cultivo, las globulinas formadas y acumuladas se pierden por algún fenómeno de degradación o de deficiencias en su acumulación.

Las globulinas de los cultivos de oscuridad (Fig. No. 34), muestran un comportamiento similar al de fotoperiodo, aunque en este caso las fracciones embrionarias que presentan niveles más importantes son la torpeda y cotiledonar al igual que el caso de las albúminas en estas condiciones, en este caso también el incremento en concentración se da a partir del día de cultivo 27 (2.978 mg de proteína/g de tejido para el estadio de torpeda y 0.413 mg de proteína/g de tejido para el estadio de cotiledonar) y alcanzan sus máximos en el día 33 (4.98 mg de proteína/g de tejido en el estadio de torpeda y 3.826 mg de proteína/g de tejido en el estadio cotiledonar). El posterior descenso de estas proteínas llega hasta 1.68 mg de proteína/g de tejido en el estadio torpeda y 1.284 mg de proteína/g de tejido en el estadio cotiledonar. En general se observan mayores niveles de globulinas en el tratamiento de fotoperiodo que en el de oscuridad, por lo que los posteriores experimentos de manipulaciones de medio fueron diseñados en fotoperiodo (a excepción del de ABA el cual es fotolábil).

#### V.6.7. RELACION ALBUMINAS/GLOBULINAS

La proporción entre los niveles de albúminas y globulinas de las diferentes fracciones embrionarias y en cada día de cosecha fueron evaluados con el fin de determinar la importancia de los niveles de globulinas en mg de proteína/g de tejido con respecto a los niveles de albúminas. Los resultados obtenidos en este parámetro se muestran en las Fig. No. 35, 36, 37 y 38.

En estas figuras se observa que la relación A/G de los cultivos en condiciones de oscuridad y fotoperiodo no muestra una tendencia definida durante el cultivo, ya que se observa una gran irregularidad en los niveles alcanzados por cada estadio de desarrollo que parece acentuarse más en el caso de los extractos de callos y de embriones en estadio cotiledonar en oscuridad (Fig. No. 38) y en los extractos de peciolo, callo y de embriones en estadio corazón-globular en fotoperiodo (Fig. No. 37).

Sin embargo, podemos decir de manera general, que los índices de la relación A/G, tienden en ambas condiciones a ser muy altos, encontrando valores máximos en cultivos en oscuridad de hasta 12.85 (en embriones cotiledonares), en tanto que en fotoperiodo, los máximos alcanzados fueron de 6.68 (en embriones corazón-globular), lo que representa una diferencia de casi el doble entre éstos tratamientos.

RELACION ALBUMINAS/GLOBULINAS  
CINETICA DE DESARROLLO EMBRIONARIO  
FOTOPERIODO

DIAS DE CULTIVO	ESTADIO DE DESARROLLO				
	PECIOLLO	CALLO	COR-GLOB	TORPEDO	COTILED.
3	1.4				
6	0.98				
9	0.961				
12	3.99				
15	4.46				
18	6.94				
21			6.684	1.923	
24			2.77	1.108	
27		6.114	1.525	0.673	
30		1.558	2.478	1.385	
33		1.42	3.506	1.82	2.146
36		1.41	6.062	4.6	2.289
39		0.799	2.5	2.59	3.783
42		0.619	1.09	2.44	-

Fig. No. 35. Relación albúminas/globulinas para las fracciones embrionarias de los lotes de ES cultivados en medio de desarrollo basal del día de cultivo 3 al 42, en condiciones de fotoperíodo.

RELACION ALBUMINAS/GLOBULINAS  
CINETICA DE DESARROLLO EMBRIONARIO  
OSCURIDAD

DIAS DE CULTIVO	ESTADIO DE DESARROLLO			
	CALLO	COR-GLOB	TORPEDO	COTILED.
18				
21		4.554	3.492	
24		5.13	1.76	
27	7.99	6.05	1.211	
30	7.476	5.009	1.478	12.85
33	2.846	3.68	2.098	9.37
36	3.575	2.386	3.957	2.56
39	13.118	1.28	3.47	2.56
42		1.607	7.76	6.73

Fig. No. 36. Relación albúminas/globulinas para las fracciones embrionarias de los lotes de ES cultivados en medio de desarrollo basal del día de cultivo 18 al 42, en condiciones de oscuridad.

### ALBUMINAS/GLOBULINAS FOTOPERIODO

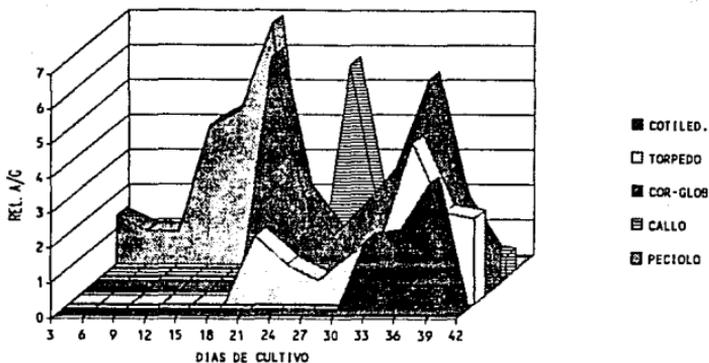


Fig. No. 37. Relación albúminas/globulinas de los extractos de callo, pecíolo, estadios corazón-globular, torpedo y cotiledonar de ES cultivados en medio de desarrollo basal del día de cultivo 3 al 42 en condiciones de fotoperiodo.

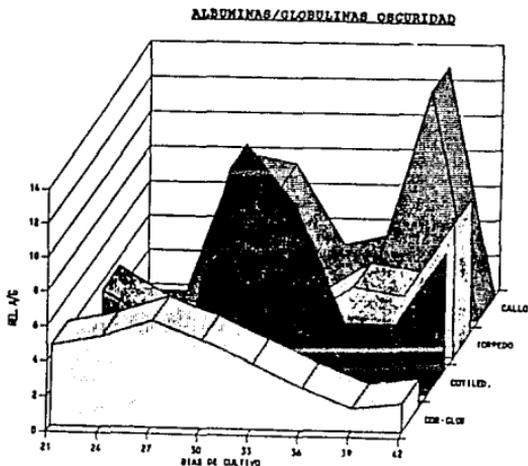


Fig. No. 38. Relación albúminas/globulinas de los extractos de callo, estadios corazón-globular, torpedo y cotiledonar de ES cultivados en medio de desarrollo basal del día de cultivo 21 al 42 en condiciones de oscuridad.

#### V.6.8. PATRONES POLIPEPTIDICOS DE LAS PROTEINAS DE LOS DIFERENTES ESTADIOS DE DEBARROLLO EMBRIONARIO.

Del análisis electroforético por SDS-PAGE de las diferentes fracciones embrionarias obtenidas en cada una de las cosechas realizadas, se obtuvieron los patrones polipeptídicos de las fracciones de albuminas y globulinas que se muestran en las siguientes fotografías de los geles obtenidos. Estos fueron elaborados con los extractos de los diferentes días de cosecha de cada estadio de desarrollo en particular, de manera que se pueden observar los cambios de los patrones del mismo estadio de desarrollo los diferentes días de cultivo y también las diferencias en los patrones de los estadios de desarrollo entre sí, a cualquier tiempo de cultivo.

#### CULTIVO EN FOTOPERIODO

##### ESTADIO CORAZON-GLOBULAR

En la Fig. No. 39 se muestra la fotografía del gel con los patrones polipeptídicos obtenidos para los extractos de albuminas y globulinas del estadio corazón-globular. Estos patrones muestran alta contaminación de bandas de diferente peso molecular, esto probablemente sea debido a que hay arrastre de globulinas en el amortiguador no salino y de albuminas en el amortiguador salino. Sin embargo a pesar de esta contaminación puede observarse en los patrones correspondientes a las globulinas la predominancia por grosor e intensidad de algunas bandas, las cuales son apenas visibles en el extracto a los 30 días y son más evidentes y claras en los extractos de los días de cultivo 33, 36, 39 y 42, siendo los extractos de 36 y 39 días, los más importantes.

Estas bandas importantes tienen un P.M. aproximado de 60, 48, 40, 32, 23 y 18 kD y con relación al patron característico de las globulinas 7 S y 11 S, presentan un 100 % de similitud, ya que las mismas bandas se presentan en los extractos de semilla; sin embargo, dada la alta contaminación de los extractos y que probablemente a este tiempo de cultivo quizá no se encuentren totalmente formadas estas proteínas de reserva, no podemos decir que corresponden totalmente a la 7 S y 11 S de semilla en estos embriones somáticos, por lo que es necesario realizar el análisis de estas fracciones por Rocket inmunoelectroforesis y así determinar precisamente si las proteínas con estos patrones polipeptídicos son reconocidas por los anticuerpos obtenidos contra las globulinas de las semillas de alfalfa.

## TORPEDO JOVEN

En la Fig. No. 40 se pueden apreciar los diferentes patrones polipeptídicos correspondientes a las fracciones de albúminas y globulinas de los embriones en estadio torpedo joven, las cuales no muestran la gran contaminación observada en los extractos del estadio de corazón-globular, posiblemente debido a que en este estadio de desarrollo, las proteínas presentes cuentan ya con características químicas que facilitan su separación y extracción.

En los extractos de globulinas de este estadio de desarrollo se observa claramente la conformación progresiva de las globulinas del estadio corazón-globular al torpedo joven y en los patrones de éste correspondientes a los días de cultivo 30 y 36, se observa la presencia de bandas características de las globulinas de semilla que corresponden a polipéptidos característicos de las proteínas 7 S<sub>1</sub> y 11 S<sub>1</sub>. Algunos de éstos polipéptidos presentes en los extractos analizados muestran un P. M. aproximado de 60, 55, 50, 45, 42, 40, 27 y 23 kD y en general muestra un 83.3 % de similitud con el patrón de ambas proteínas presentes en los extractos de semilla.

El efecto que antes se había mencionado de una pérdida de éstas proteínas hacia el final del cultivo es muy claro en el gel de éstos embriones, en donde los extractos de 39 y 42 días presentan muy pocas bandas apenas visibles. Así podemos ubicar al estadio torpedo joven de 36 días como el que presenta el máximo contenido de proteínas de reserva.

## TORPEDO MADURO

En la Fig. No. 41, se observa la fotografía del gel correspondiente a los extractos de albúminas y globulinas del estadio de torpedo maduro, que muestran una clara diferencia entre los patrones de albúminas y globulinas, que evidencia que en este estadio de desarrollo la separación y extracción de dichas proteínas es más precisa. De esta manera, los geles permiten un mejor análisis al no mostrar gran contaminación.

En los patrones para este estadio de desarrollo, se observa un resultado similar al del torpedo joven ya que en la fracción de globulinas de los primeros días de cultivo (30 días carril 10), el patrón no es muy claro ni característico de las globulinas de semilla; sin embargo, hacia los 33 y 36 días de cultivo, éste patrón se presenta totalmente formado y muy interesante pues muestra una gran abundancia de éstas bandas características de las globulinas 7 S<sub>1</sub> y 11 S<sub>1</sub>, las cuales son idénticas a las de la semilla, los polipéptidos

componentes presentan un P.M. aproximado de 60, 50, 45, 40, 36, 32, 27 y 23 kD y un 100 % de similitud con respecto al patrón de las globulinas de la semilla.

Se observa también que el extracto de 39 días muestra la desaparición progresiva de los polipéptidos componentes de éstas proteínas y hacia el día 42, no se observa ya ninguna banda, esto es hay una desaparición completa de los polipéptidos constituyentes de las proteínas de reserva, que confirma una vez más la pérdida de las globulinas en los últimos días del cultivo in vitro.

### TORPEDO TARDIO

En el gel de la Fig. No. 42, correspondiente a los extractos de albúminas y globulinas del estadio de torpedo tardío, se observa nuevamente una gran contaminación de bandas correspondientes a la fracción de globulinas en la fracción de albúminas. Las bandas importantes presentes en la fracción de globulinas presentan un P. M. aproximado de 70, 60, 48, 45, 42, 36, 33, 30, 27 y 23 kD y un 90 % de similitud con el patrón de las proteínas de reserva de la semilla, por lo que podemos decir que se trata de las mismas proteínas y que en este estadio de desarrollo a partir del día de cultivo 30 al 39 se cuenta con altos niveles de éstas proteínas de reserva, teniendo un máximo en la definición del patrón a los 36 días de cultivo.

Algo evidente en este gel y que también se ha observado en los geles de los otros estadios de desarrollo, es que se observa nuevamente la desaparición de el patrón completo de globulinas en el extracto correspondiente al día de cultivo 42, esto indica nuevamente la pérdida total de los polipéptidos constituyentes de éstas proteínas de reserva.

En este gel se observan patrones diferenciales de albúminas y globulinas (producto de una buena extracción), en los carriles en los que se presentan ya que los extractos de albúminas a los 39 y 42 días no muestran polipéptidos componentes, al igual que los extractos de globulinas de los días de cultivo 30 y 33. Los patrones polipeptídicos obtenidos en esta condición de cultivo en oscuridad son diferentes a los obtenidos en fotoperiodo mostrando aquí polipéptidos cuyo P.M. aproximado es de 70, 60, 50, 45, 40, 36, 32, 27 y 23 kD y teniendo por lo tanto un 100 % de similitud con los patrones obtenidos de las semillas. Un aspecto interesante de estos cultivos es que aparentemente hay una relación entre la presencia de la albúminas y las globulinas, ya que en los días de cultivo en que las albúminas están presentes en altos niveles, no pudimos detectar globulinas y cuando los niveles de albúminas decaen, las globulinas son evidentes.

CORAZON GLOBULAR

Los patrones polipeptídicos de las fracciones de albúminas y globulinas de embriones somáticos en estadio de corazón-globular cultivados en condiciones de oscuridad, se muestran en la Fig. No. 43, en donde se observan patrones diferenciales de albúminas y globulinas (producto de una buena extracción), en los que se observa que en los extractos de albúminas de los días de cultivo 39 y 42, hay desaparición de bandas, así como en los extractos de globulinas de los días de cultivo 30 y 33, donde casi no se observan polipéptidos componentes.

Los patrones polipeptídicos obtenidos en esta condición de cultivo en oscuridad, son diferentes a los obtenidos en fotoperíodo, mostrando aquí polipéptidos cuyo P. M. aproximado es de 60, 40, 32 y 27 kD, que corresponden en un 100 % de similitud con los patrones obtenidos de las semillas.

Un aspecto interesante de éstos cultivos es que aparentemente hay una relación entre la presencia de las albúminas y las globulinas, ya que en los días de cultivo en que las albúminas están presentes en altos niveles, no pudimos detectar globulinas y cuando los niveles de albúminas decaen, las globulinas son evidentes, lo que sugiere un efecto de degradación o hidrólisis de las globulinas en presencia de albúminas.

TORPEDO JOVEN

En la Fig. No. 44, se presenta el gel correspondiente a las fracciones de albúminas y globulinas de embriones somáticos en estadios de desarrollo de torpedo joven, en este gel se observa que a diferencia de los patrones polipeptídicos obtenidos en los extractos de este mismo estadio de desarrollo en fotoperíodo hay muchas más bandas de alto y bajo peso molecular y las más importantes obtenidas aquí tienen un P. M. aproximado de 48, 40, 32, 27, 18 kD y por lo tanto un 100 % de similitud con relación al patrón obtenido en la semilla. Tanto los patrones de albúminas como de globulinas muestran un enriquecimiento de bandas con relación a la fracción de corazón-globular, pero también se muestran muy difusos, lo que no permite establecer si todos éstos polipéptidos están involucrados en la formación de las proteínas de reserva maduras.

También se observa que en los extractos de globulinas de la cosecha a los 42 días se cuenta con el patrón casi completo de las globulinas de los 39 días, lo que indica que si bien hay una ligera baja en la intensidad de las bandas componentes, es posible encontrar a este tiempo de cultivo algunos polipéptidos, lo cual no ocurría con los extractos de globulinas del cultivo en fotoperíodo.

#### TORPEDO MADURO

Las fracciones de albúminas y globulinas del estadio embrionario de torpedo maduro mostradas en el gel de la Fig. No. 45, presentan patrones polipeptídicos diferenciales, los cuales en el caso de las globulinas muestran bandas cuyo P.M. aproximado es de 89, 70, 60, 55, 50, 40, 36, 30, 27, 23, 18 kD y que corresponde a un 92.5 % de similitud con relación al patrón característico de las globulinas de las semillas, en este estadio de desarrollo, se observa todavía una gran cantidad de bandas en los extractos de globulinas, sin embargo hay una mayor conformación de las proteínas presentes que están bien definidas para todos los días de cultivo lo que de alguna manera indica que la pérdida drástica de estas proteínas que se había observado en los extractos de fotoperíodo, en éstos extractos de oscuridad no ocurre de igual manera. Esto sugiere que en condiciones de oscuridad la formación y conformación de las proteínas de reserva ocurre más lentamente que en fotoperíodo y que hacia el final del cultivo in vitro no ocurre todavía la pérdida de estas proteínas.

#### TORPEDO TARDIO

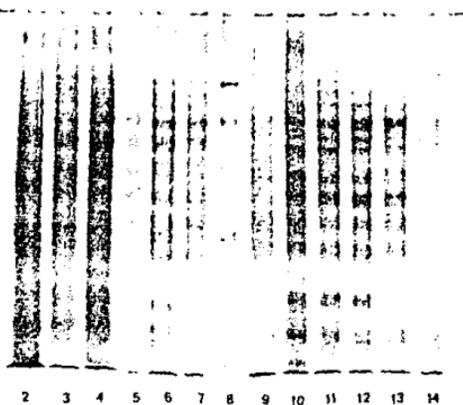
En la Fig. No. 46, se observan los patrones polipeptídicos de albúminas y globulinas del estadio embrionario de torpedo tardío, en los que se observa la formación progresiva de los patrones polipeptídicos característicos de las globulinas de la semilla, ya que los extractos de globulinas de éstos embriones somáticos tienen un P. M. aproximado de 70, 60, 55, 40, 36, 33, 30, 27, 18 kD lo que representa un 87.5 % de similitud con relación a la semilla, se observa el enriquecimiento de la fracción de albúminas en este estadio de desarrollo en los días de cultivo 39 y 42 y por otro lado en los extractos de globulinas, se muestra un progresivo enriquecimiento en número e intensidad de las bandas y de intensidad de las mismas hacia los días de cultivo presentes, las cuales para el día de cultivo 42 se empiezan a perder.

También aquí es evidente y muy interesante el contar con éstas globulinas hacia el final del cultivo, ya que la condición del cultivo en oscuridad puede favorecer que las proteínas de reserva sintetizadas y de alguna manera acumuladas por los embriones somáticos no se pierdan, sin embargo, es preciso reconocer específicamente éstas proteínas mediante el Rocket inmunolectroforesis y establecer si efectivamente se trata de las proteínas de interés.

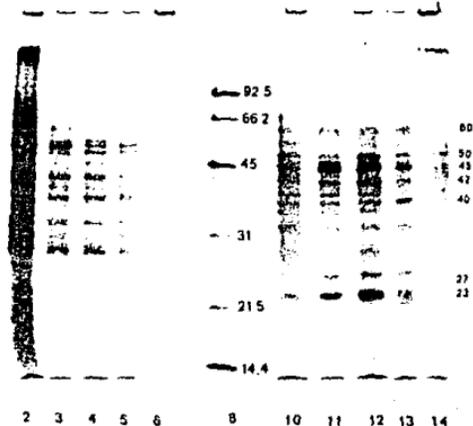
#### COTILEDONAR

En el gel de la Fig. No. 47, se observan los extractos de albúminas y globulinas del estadio cotiledonar de los embriones somáticos cultivados en condiciones de oscuridad en los que nuevamente se observa contaminación en los patrones polipeptídicos de los extractos de albúminas con los de las globulinas, los cuales se presentan en éste caso muy limpios y claros sobre todo en los extractos de los días de cultivo 36 y 39, éstos polipéptidos tienen un P.M. aproximado de 89, 70, 60, 50, 48, 45, 42, 36, 33, 27, 22 kD y un 90.0 % de similitud con relación al patrón característico de la semilla. Los patrones de globulinas que aquí se muestran corresponden muy claramente a los característicos de la 7 S y 11 S de la semilla.

Estos resultados demuestran nuevamente que el desarrollo embrionario ocurre más lentamente en los cultivos en oscuridad, pudiéndose encontrar las proteínas de reserva en los días de cultivo 33, 36 y 39, aunque al igual que en caso de fotoperiodo hacia el día 42, ocurre la pérdida de éstas proteínas.



CARRIL	MUESTRA
2	Albuminas 30 días
3	Albuminas 33 días
4	Albuminas 36 días
5	Albuminas 39 días
6	Albuminas 42 días
8	Marcadores de P. M.



CARRIL	MUESTRA
10	Globulinas 30 días
11	Globulinas 33 días
12	Globulinas 36 días
13	Globulinas 39 días
14	Globulinas 42 días

Fig. No. 39. Patrones polipeptídicos correspondientes a los extractos de albuminas (carriles 2 a 6) y globulinas (carriles 10 a 14), de embriones somáticos cultivados en medio de desarrollo basal y en condiciones de fotoperíodo a los 30, 33, 36, 39 y 42 días de cultivo, obtenidos en el estado embrionario de corazón-globular (F IV del gradiente de densidad discontinua de sacarosa).

Fig. No. 40. Patrones polipeptídicos correspondientes a los extractos de albuminas (carriles 2 a 6) y globulinas (carriles 10 a 14), de embriones somáticos cultivados en medio de desarrollo basal y en condiciones de fotoperíodo a los 30, 33, 36, 39 y 42 días de cultivo, obtenidos en el estado embrionario de torpeda joven (F III del gradiente de densidad discontinua de sacarosa).

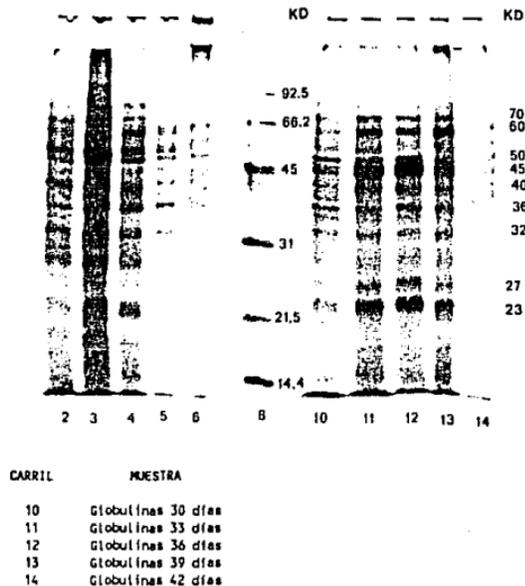
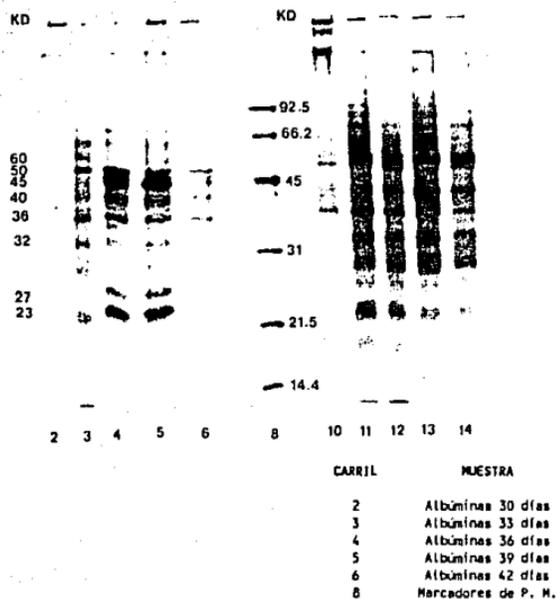
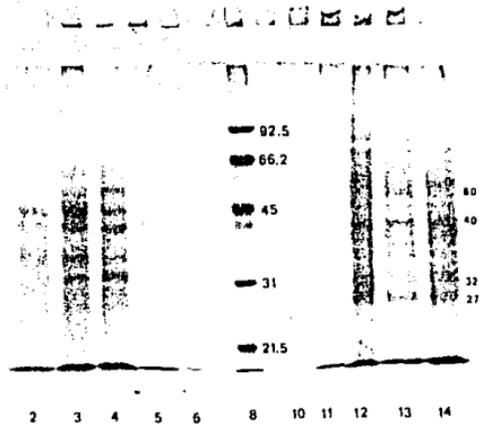


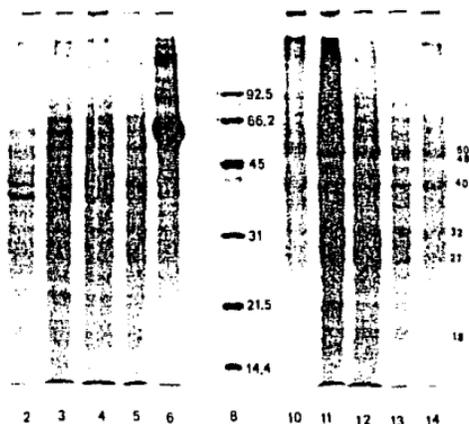
Fig. No. 41. Patrones polipeptídicos correspondientes a los extractos de globulinas (carriles 2 a 6) y albúminas (carriles 10 a 14), de embriones somáticos cultivados en medio de desarrollo basal y en condiciones de fotoperíodo a los 30, 33, 36, 39 y 42 días de cultivo, obtenidos en el estado embrionario de torpeda maduro (FII del gradiente de densidad discontinua de sacarosa).

Fig. No. 42. Patrones polipeptídicos correspondientes a los extractos de albúminas (carriles 2 a 6) y globulinas (carriles 10 a 14), de embriones somáticos cultivados en medio de desarrollo basal y en condiciones de fotoperíodo a los 30, 33, 36, 39 y 42 días de cultivo, obtenidos en el estado embrionario de torpeda tardío (FI del gradiente de densidad discontinua de sacarosa).



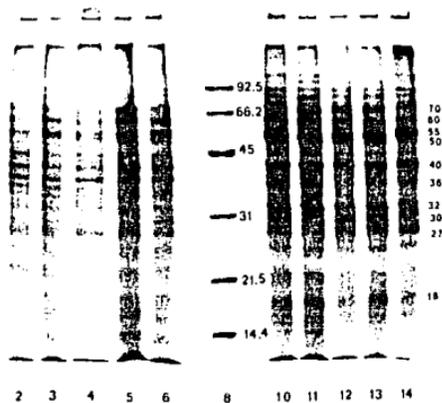
CARRIL	MUESTRA
2	Albúminas 30 días
3	Albúminas 33 días
4	Albúminas 36 días
5	Albúminas 39 días
6	Albúminas 42 días
8	Marcadores de P. M.

Fig. No. 43. Patrones polipeptídicos correspondientes a los extractos de albúminas (carriles 2 a 6) y globulinas (carriles 10 a 14), de embriones somáticos cultivados en medio de desarrollo basal y en condiciones de oscuridad a los 30, 33, 36, 39 y 42 días de cultivo, obtenidos en el estadio embrionario de corazón-globular (F IV del gradiente de densidad discontinua de sacarosa).

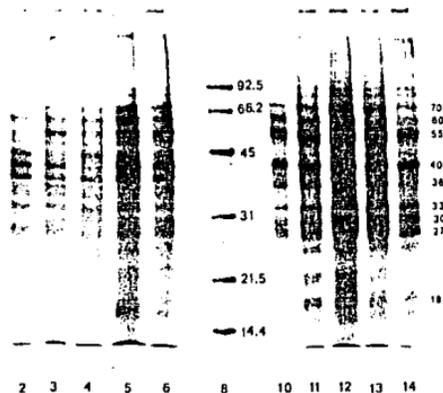


CARRIL	MUESTRA
10	Globulinas 30 días
11	Globulinas 33 días
12	Globulinas 36 días
13	Globulinas 39 días
14	Globulinas 42 días

Fig. No. 44. Patrones polipeptídicos correspondientes a los extractos de albúminas (carriles 2 a 6) y globulinas (carriles 10 a 14), de embriones somáticos cultivados en medio de desarrollo basal y en condiciones de oscuridad a los 30, 33, 36, 39 y 42 días de cultivo, obtenidos en el estadio embrionario de torpedó joven (F III del gradiente de densidad discontinua de sacarosa).



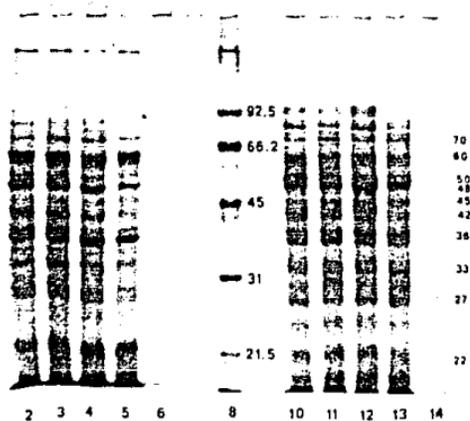
CARRIL	MUESTRA
2	Albúminas 30 días
3	Albúminas 33 días
4	Albúminas 36 días
5	Albúminas 39 días
6	Albúminas 42 días
8	Merzadores de P. M.



CARRIL	MUESTRA
10	Globulinas 30 días
11	Globulinas 33 días
12	Globulinas 36 días
13	Globulinas 39 días
14	Globulinas 42 días

Fig. No. 45. Patrones polipeptídicos correspondientes a los extractos de albúminas (carriles 2 a 6) y globulinas (carriles 10 a 14), de embriones somáticos cultivados en medio de desarrollo basal y en condiciones de oscuridad a los 30, 33, 36, 39 y 42 días de cultivo, obtenidos en el estadio embrionario de torpedo maduro (F II del gradiente de densidad discontinua de sacarosa).

Fig. No. 46. Patrones polipeptídicos correspondientes a los extractos de albúminas (carriles 2 a 6) y globulinas (carriles 10 a 14), de embriones somáticos cultivados en medio de desarrollo basal y en condiciones de oscuridad a los 30, 33, 36, 39 y 42 días de cultivo, obtenidos en el estadio embrionario de torpedo tardío (F I del gradiente de densidad discontinua de sacarosa).



CARRIL	MUESTRA	CARRIL	MUESTRA
2	Albúminas 30 días	10	Globulinas 30 días
3	Albúminas 33 días	11	Globulinas 33 días
4	Albúminas 36 días	12	Globulinas 36 días
5	Albúminas 39 días	13	Globulinas 39 días
6	Albúminas 42 días	14	Globulinas 42 días
8	Marcadores de P. M.		

Fig. No. 47. Patrones polipeptídicos correspondientes a los extractos de albúminas (carriles 2 a 6) y globulinas (carriles 10 a 14), de embriones somáticos cultivados en medio de desarrollo basal y en condiciones de oscuridad a los 30, 33, 36, 39 y 42 días de cultivo, obtenidos en el estado embrionario de cotiledonar (F 0 del gradiente de densidad discontinua de sacarosa).

#### V.6.9. ROCKET INMUNOELECTROFORESIS DE LAS MUESTRAS DE LA CINETICA

El análisis de las muestras mediante Rocket inmunolectroforesis fue realizado para todas las fracciones de globulinas de las diferentes fracciones embrionarias obtenidos en todos los días de cosecha, los resultados fueron los siguientes:

##### CALLOS

En la Fig. No. 48 correspondiente al "Rocket" de los extractos de globulinas de callos de los días de cultivo 18 al 42, se observa un único inmunoprecipitado formado que corresponde al extracto de globulinas de semilla de concentración conocida (1250 ng/5  $\mu$ l), ya que los extractos de globulinas de callo de los diferentes días de cultivo, no formaron inmunoprecipitado alguno, lo que muestra que en este tejido no hay presencia de las proteínas de reserva.

##### CORAZON-GLOBULAR

En la Fig. No. 49 se observa la fotografía de la placa de inmunolectroforesis de los extractos de globulinas de embriones somáticos del estadio corazón-globular, obtenidos durante el cultivo in vitro de 21 a 42 días en condiciones de fotoperiodo. En esta placa de inmunolectroforesis, al igual que en la anterior, se observa que los únicos inmunoprecipitados formados corresponden a los extractos de globulinas de semilla de concentraciones conocidas (625 y 312.5 ng), ya que los extractos de globulinas de la fracción de embriones somáticos correspondientes al estadio de corazón-globular de los diferentes días de cultivo, no formaron ningún inmunoprecipitado. Así, es evidente que a este tiempo de cultivo y en este estadio de desarrollo, aún no ocurre la formación ni acumulación de las proteínas de reserva, las cuales no son aún detectables por los anticuerpos vs. las globulinas de las semillas de alfalfa.

##### TORPEDO JOVEN

En la Fig. No. 50, se observa la placa de inmunolectroforesis para las fracciones de globulinas de los extractos de embriones somáticos de los estadios de torpedo joven y torpedo maduro, obtenidos durante el cultivo in vitro de 30 a 42 días en condiciones de fotoperiodo y oscuridad.

En ésta placa de inmunolectroforesis es posible observar que tanto para los estadios de desarrollo de torpedo joven y torpedo maduro es posible encontrar proteínas de reserva específicas de las semillas de alfalfa A7034 desde el día de cultivo 30 hasta el día 39, ya que en el caso de los extractos de globulinas obtenidos a partir de la fracción embrionaria de torpedo joven cultivada en oscuridad, no se obtuvo la formación de ningún inmunoprecipitado, al igual que en el caso de los extractos de globulinas de éstos estadios de desarrollo correspondientes a las cosechas de 42 días. Así es posible determinar que en los estadios de desarrollo embrionario intermedio (estadio torpedo), el contenido de proteínas de reserva en los embriones es mayor que en los estadios juveniles y en los estadios finales del desarrollo.

### TORPEDO TARDIO

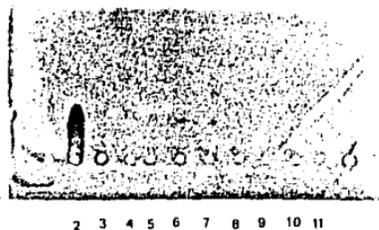
Para los extractos de globulinas de los extractos de embriones somáticos de los estadios de torpedo tardío y cotiledonar, obtenidos durante el cultivo in vitro de 30 a 42 días en condiciones de fotoperíodo, se obtuvieron los resultados mostrados en la Fig. No. 51, en la que se observa que en los extractos de globulinas de los embriones somáticos de los estadios de desarrollo de torpedo tardío y cotiledonar, a diferentes tiempos de cultivo se pueden encontrar ya proteínas de reserva, las cuales son de la misma naturaleza que las encontradas en la semilla, ya que son totalmente reconocidas por los anticuerpos vs. 7 S y 11 S de semillas de alfalfa.

Se observa también que la altura de los inmunoprecipitados obtenidos con los extractos de torpedo tardío, son mayores, que los obtenidos con los extractos correspondientes a los extractos de estadio cotiledonar. Esto indica que los estadios de desarrollo avanzados pero no en fase terminal, cuentan con mayores niveles de proteínas de reserva específicas de la semilla, que los estadios de desarrollo embrionario finales. Este mismo efecto es evidente con el tiempo de cultivo, ya que después de los 36 días de cultivo a medida que el desarrollo continúa, el contenido de proteínas de reserva disminuye.

## COTILEDONAR

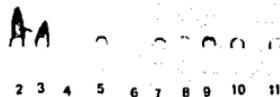
En la Fig. No. 52, se presenta la placa de Rocket inmunolectroforesis para las fracciones de globulinas de los extractos de embriones somáticos de los estadios de cotiledonar y torpedo tardío, obtenidos durante el cultivo in vitro de 30 a 42 días en condiciones de fotoperíodo y oscuridad.

En ésta placa de inmunolectroforesis se observa que con los extractos de globulinas correspondientes al estadio de desarrollo cotiledonar en condiciones de fotoperíodo y oscuridad, no se obtuvo la formación de ningún inmunoprecipitado, lo cual confirma que hacia el final del desarrollo embrionario in vitro, las proteínas de reserva se pierden, es muy claro que esto ocurre en un período muy corto ya que como es posible observar en ésta placa, en el extracto de globulinas del estadio de torpedo tardío de 30 días en fotoperíodo, hay una gran cantidad de éstas proteínas de reserva específicas de las semillas de alfalfa. Así, podemos decir que aún cuando puedan detectarse niveles de globulinas en los extractos de cotiledonar, éstas no corresponden a las proteínas de reserva de nuestro interés.



POZO	MUESTRA
2	CTRL Semilla 1250 ng
3	Globulinas de callo de 18 d.
4	Globulinas de callo de 21 d.
5	Globulinas de callo de 24 d.
6	Globulinas de callo de 27 d.
7	Globulinas de callo de 30 d.
8	Globulinas de callo de 33 d.
9	Globulinas de callo de 36 d.
10	Globulinas de callo de 39 d.
11	Globulinas de callo de 42 d.

Fig. No. 48. Placa de "Rocket" inmunoelectroforesis para las fracciones de globulinas de los extractos de callo obtenidos durante el cultivo in vitro de 18 a 42 días en condiciones de fotoperíodo.



POZO	MUESTRA
2	CTRL Semilla 625 ng
3	CTRL Semilla 312.5 ng.
4	Corazón-globular 42 d.
5	Corazón-globular 39 d.
6	Corazón-globular 36 d.
7	Corazón-globular 33 d.
8	Corazón-globular 30 d.
9	Corazón-globular 27 d.
10	Corazón-globular 24 d.
11	Corazón-globular 21 d.

Fig. No. 49. Placa de "Rocket" inmunoelectroforesis para las fracciones de globulinas de los extractos de embriones somáticos del estado corazón-globular, obtenidos durante el cultivo in vitro de 21 a 42 días en condiciones de fotoperíodo.



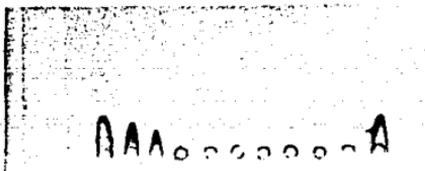
POZO	MUESTRA
2	Torpedo joven 30 d. fotop.
3	Torpedo joven 33 d. fotop.
4	Torpedo joven 36 d. fotop.
5	Torpedo joven 39 d. fotop.
6	Torpedo joven 42 d. fotop.
7	Torpedo joven 30 d. osc.
8	Torpedo joven 39 d. osc.
9	Torpedo joven 42 d. osc.
10	Torpedo maduro 30 d. fotop.
11	Torpedo maduro 33 d. fotop.
12	Torpedo maduro 36 d. fotop.

Fig. No. 50. Placa de "Rocket" inmunoelectroforesis para las fracciones de globulinas de los extractos de embriones somáticos de los estadios de torpedo joven y torpedo maduro, obtenidos durante el cultivo in vitro de 30 a 42 días en condiciones de fotoperíodo y oscuridad.



POZO	MUESTRA
2	CTRL Semilla 1250 ng.
3	Cotiledonar joven 33 d.
4	Torpedo tardío 39 d.
5	Torpedo tardío 39 d.
6	Torpedo tardío 33 d.
7	Torpedo tardío 36 d.
8	Cotiledonar 30 d.
9	Cotiledonar 33 d.
10	Cotiledonar 36 d.
11	Cotiledonar 39 d.
12	Cotiledonar 42 d.

Fig. No. 51. Placa de "Rocket" inmunoelectroforesis para las fracciones de globulinas de los extractos de embriones somáticos de los estadios de torpedo tardío y cotiledonar obtenidos durante el cultivo in vitro de 30 a 42 días en condiciones de fotoperíodo.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

POZO	MUESTRA
2	CTRL Semilla 1250 mg.
3	CTRL Semilla 625 mg.
4	CTRL Semilla 312.5 mg.
5	Cotiledonar 30 d. osc.
6	Cotiledonar 33 d. osc.
7	Cotiledonar 36 d. osc.
8	Cotiledonar 39 d. osc.
9	Cotiledonar 42 d. osc.
10	Cotiledonar 39 d. osc.
11	Cotiledonar 42 d. osc.
12	Torpedo tardío 39 d. fotop.

Fig. No. 52. Placa de "Rocket" inmunoelectroforesis para las fracciones de globulinas de los extractos de embriones somáticos de los estadios de cotiledonar y torpedo tardío, obtenidos durante el cultivo in vitro de 30 a 42 días en condiciones de fotoperíodo y oscuridad.

V.6.10. CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS DE LAS DIFERENTES  
FRACCIONES EMBRIONARIAS.

En éste estudio sólo se buscó la presencia de carbohidratos principalmente en la forma de almidón que se encontraba en la fracción de albúminas de las diferentes fracciones embrionarias de todos los días de cosecha.

La presencia de almidón en éstas fragciones fue revelada indirectamente, por la estimación de los niveles de actividad de la enzima alfa-amilasa, por hidrólisis del almidón presente en placas de agar-almidón al 2% p/v y su posterior revelado con solución de yodo-yoduro. La apariencia de éstas placas se muestra en la Fig. No. 53. Los resultados de los diámetros obtenidos en los tratamientos de oscuridad y fotoperiodo, se muestran en las Figs. No. 54 y 55.

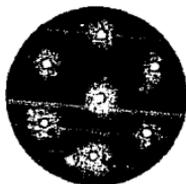


Fig. No 53. Placa de agar-almidón, en la que se muestran los halos producidos por la hidrólisis del almidón del agar por la alfa-amilasa presente en las muestras de extractos de albúminas de ES.

ACTIVIDAD HIDROLITICA DE LA ALFA-AMILASA EN FOTOPERIODO ACTIVIDAD RELATIVA AL CONTROL A LAS 48 HORAS						
EDO. EMBRIONARIO	27 D	30 D	33 D	36 D	39 D	42 D
CALLO	0.75			2.0	1.19	
GLOB-CORAZON		0.92	1.05	0.7	1.25	
TORPEDO JOVEN		0.92	0.98	1.5	1.37	1.12
TORPEDO MADURO		0.92	1.12	1.4	1.25	0.52
TORPEDO TARDIO		0.92			1.19	0.46
COTILEDONAR			1.18	1.5	1.37	

Tabla No. 54. Actividad hidrolítica de la alfa-amilasa expresada en U/ml de los extractos de albúminas de los ES cultivados en medio de desarrollo basal del día de cultivo 27 al día 42 en fotoperiodo. La actividad es relativa al control a las 48 horas.

ACTIVIDAD HIDROLITICA DE LA ALFA-AMILASA EN OSCURIDAD ACTIVIDAD RELATIVA AL CONTROL A LAS 48 HORAS						
EDO. EMBRIONARIO	27 D	30 D	33 D	36 D	39 D	42 D
CALLO		1.12	1.05	0.9	2.0	1.0
GLOB-CORAZON	0.8	1.19	0.98	1.05	1.90	1.58
TORPEDO JOVEN		1.19	1.38	0.9	2.30	1.58
TORPEDO MADURO		1.25	1.44	0.85	2.10	1.42
TORPEDO TARDIO		1.12	1.77	0.75	2.10	
COTILEDONAR	0.66	1.05	1.90	0.70	2.0	0.5

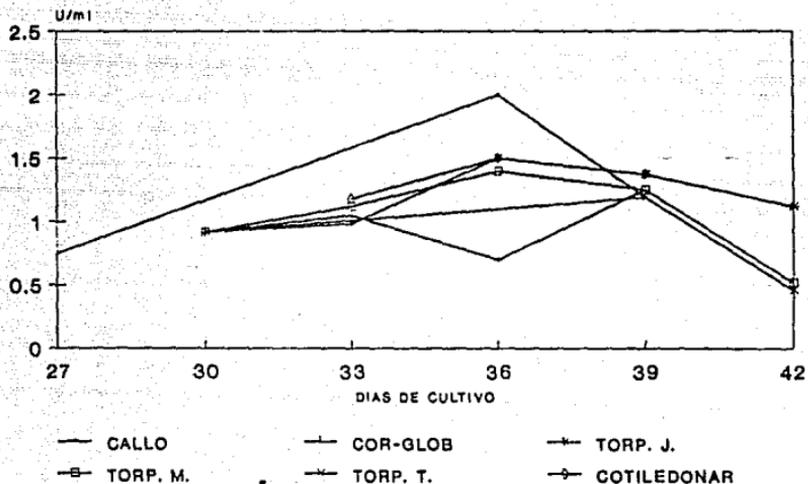
Tabla No. 55. Actividad hidrolítica de la alfa-amilasa expresada en U/ml de los extractos de albúminas de los ES cultivados en medio de desarrollo basal del día de cultivo 27 al día 42 en condiciones de oscuridad. La actividad es relativa al control a las 48 horas.

En las figuras anteriores se observa que la actividad hidrolítica de la alfa-amilasa en los extractos de fotoperíodo es en general menor que la obtenida con los extractos de oscuridad y que los estadios embrionarios que presentan mayores índices de actividad son el torpedo y el cotiledonar en ambos tratamientos, así como que los días de cultivo en que los diferentes estadios embrionarios alcanzan los niveles máximos de actividad son a los 36 y 39 días en fotoperíodo y a los 33, 39 y 42 días, ya que en el día de cultivo 36, se obtuvo una disminución en éstos niveles.

Así, el comportamiento de la alfa-amilasa parece acentuarse hacia los últimos días de cultivo y sobre todo en los cultivos de oscuridad, por lo que consideramos que para este material si puede haber un efecto importante en la luz.

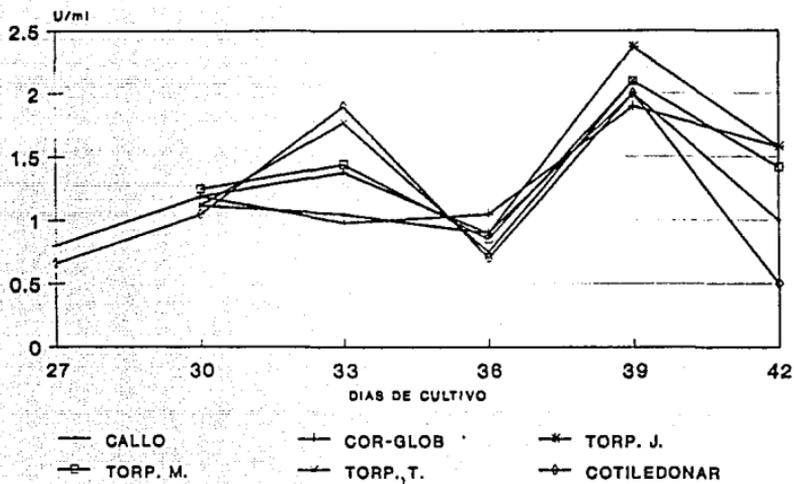
Los niveles de actividad de la alfa-amilasa, no cambian drásticamente pero si se observa que son ligeramente más altos hacia el final del cultivo, lo que señala que el comportamiento de las proteínas de reserva puede ser diferente al que sigue el almidón. Sin embargo, aún no se puede hacer un análisis confiable pues se requiere de un análisis específico del almidón y otros carbohidratos en su identificación y caracterización durante el cultivo in vitro e in vivo.

## ACTIVIDAD HIDROLITICA DE LA ALFA-AMILASA FOTOPERIODO



Actividad hidrolítica de la alfa-amilasa expresada en U/ml de los extractos de albúminas de los ES cultivados en medio de desarrollo basal del día de cultivo 27 al día 42 en condiciones de fotoperiodo. La actividad es relativa al control a las 48 horas.

## ACTIVIDAD HIDROLITICA DE LA ALFA-AMILASA OSCURIDAD



Actividad hidrolítica de la alfa-amilasa expresada en U/ml de los extractos de albúminas de los ES cultivados en medio de desarrollo basal del día de cultivo 27 al día 42 en condiciones de oscuridad. La actividad es relativa al control a las 48 horas.

De ésta manera, el análisis de actividad de alfa-amilasa no fue realizado para los ensayos de manipulaciones de medio, debido a que se requiera antes definir, implementar y estandarizar los métodos de análisis, así como establecer de manera confiable el comportamiento de los carbohidratos presentes en los ES cultivados en condiciones basales para poder apreciar realmente el efecto de éstas manipulaciones en los niveles de calidad y cantidad de los mismos.

## V.7. MANIPULACIONES DE MEDIO

Los embriones somáticos obtenidos con los diferentes tratamientos de manipulaciones de medio durante el desarrollo embrionario, fueron analizados de manera similar a los obtenidos en el cinética de desarrollo, los resultados obtenidos en cada uno de los tratamientos empleados y para cada uno de los parámetros analizados se presentan a continuación.

### V.7.1. RESULTADOS SORBITOL

A continuación se presentan los resultados obtenidos para cada uno de los parámetros evaluados en embriones somáticos cultivados in vitro en medio de desarrollo suplementado con sorbitol a concentraciones de 2, 8 y 12 % p/v, durante la 5a. y 6a. semanas de desarrollo embrionario, así como el análisis de los mismos.

#### V.7.1.1. RESPUESTA:

La evaluación de la respuesta se realizó mediante la determinación de los mg de embriones/# de callos, lo cual es una estimación indirecta de la cantidad de callos que presentan formación de embriones somáticos. Este parámetro es de gran utilidad porque permite determinar la capacidad embriogénica del cultivo, la cual puede variar por las condiciones del mismo y por los ciclos de recurrencia del propio cultivo. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. No. 56.

En este parámetro, se observa que únicamente en el tratamiento del 2 % se obtuvieron resultados similares al del control, sin embargo, en ningún caso, se superó a éste (respuesta máxima de 56.6 vs. 57.5 mg de embriones/# de callos). En tanto que a las concentraciones de sorbitol a 8 y 12 %, la cantidad de ES se vio disminuida con (respuestas entre 36 y 42 mg de embriones/# de callos), hasta en un 37 % en la cosecha a los 35 días y hasta un 11 % en las cosechas de 42 días. La explicación a éstos resultados de bajos índices de respuesta puede ser que el tiempo de exposición de sorbitol a éstas concentraciones no fue el adecuado, ya que probablemente con tiempos de exposición más breves o a menores concentraciones sobre todo en la fase media del desarrollo, no se provoca este efecto inhibitorio en el desarrollo de los embriones somáticos.

Es importante señalar que el impacto del agente sobre la respuesta del cultivo parece ser mayor en la fase intermedia del desarrollo embrionario (28 a 36 días), en tanto que para la fase terminal (36 a 42 días), la inhibición de la capacidad embriogénica es más ligera. Este efecto está relacionado a que precisamente en la fase media del desarrollo hay una mayor actividad embriogénica de los callos

que en la terminal, por lo que el nivel de abatimiento en la respuesta causado por el sorbitol, es más evidente.

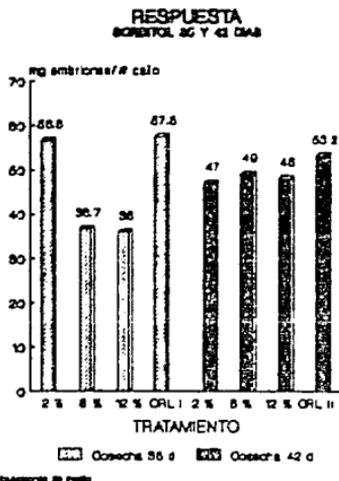


Fig. No. 56. Indices de respuesta expresados en mg de embriones/# de callos, para los tratamientos de sorbitol a 2, 8 y 12 % de las cosechas correspondientes a los 35 y 42 días de cultivo

#### V.7.1.2. RENDIMIENTO:

Las unidades de éste parámetro son mg de embriones/g callo, que es una medida de el peso en mg que aportan los ES por cada g de callo y que representa una medida indirecta de la cantidad de embriones por callo. Esta medida es útil para evaluar el cambio en peso provocado por un mayor número de embriones o también por la presencia de embriones más grandes o con una mayor densidad específica, lo cual evidencia la formación y crecimiento de los embriones somáticos en el cultivo. Nuestros resultados para éste tratamiento, se muestran en la Fig. No 57.

En los lotes de callos con ES cultivados con sorbitol al 2, 8 y 12 % del día 28 al día 35, se observa un rendimiento máximo de 650 mg de embriones/g de callo para la concentración de 2 %, lo que representa una diferencia del 46.73 % con respecto al control, estos resultados sugieren

que a esta concentración el agente puede favorecer la generación de ES. Sin embargo este efecto decrece considerablemente al cultivar los ES del día 35 al 42 en presencia de sorbitol a la misma concentración alcanzándose un nivel máximo de 230 mg de embriones/g de callo para la concentración del 2 ‰, que representa un 38.5 ‰ menos que el control, el cual también disminuye su crecimiento, por lo que la edad del cultivo parece ser un factor importante, ya que en estadios tempranos puede ser más favorable una concentración de baja disponibilidad de agua para inducir una mayor tasa de formación de los embriones somáticos o para que estos incrementen su peso. Esta consideración es en el sentido de que los ES son pequeños y por lo tanto su contenido de proteínas por unidad de biomasa es relativamente mayor, esto tiene un efecto importante en el peso fresco por embrión y por consiguiente en el rendimiento evaluado de esta manera.

#### RENDIMIENTO SORBITOL 35 Y 42 DIAS

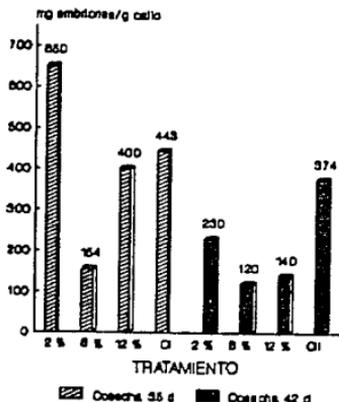


Fig. No. 57. Indices de rendimiento expresados en mg de embriones/g de callos, para los tratamientos de sorbitol a 2, 8 y 12 ‰ de las cosechas correspondientes a los 35 y 42 días de cultivo

En el rendimiento de los tratamientos con sorbitol a concentraciones de 8 y 12 ‰, se observa que éste disminuye en relación al control de 35 días en un 65.24 ‰ en la concentración de sorbitol al 8 ‰ y en un 9.71 ‰ en la concentración de 12 ‰. Con respecto al control de 42 días,

hay un decremento de 67.91 % en el tratamiento al 8 % y de 62.57 % en el tratamiento al 12 %. Estos resultados sugieren que a concentraciones mayores se causa un efecto nocivo en el desarrollo de los ES, que sin embargo no abate la formación de los mismos ya que a este tiempo se encuentra una gran proporción de embriones en estadios tempranos de desarrollo, los cuales al parecer en estos tratamientos, tienen menores índices de peso por embrión que el control y que los embriones del tratamiento del sorbitol al 2 %.

### V.7.1.3. CRECIMIENTO:

Este parámetro fue evaluado considerando los mg de callo con embriones/# de callos, que es también una medida indirecta de el cambio de peso por callo, que puede ser debido a una mayor proliferación de la masa callosa, o a un incremento en la cantidad y/o peso de los embriones somáticos. este parámetro ligado con el rendimiento y la respuesta, da una idea clara de la calidad y crecimiento global de los embriones somáticos en cultivo, los cuales parecen ser aceptables para el tratamiento al 2 % ya que en éste, se lograron índices de respuesta, rendimiento y crecimiento similares a los del control, como se observa en la Fig. No. 58

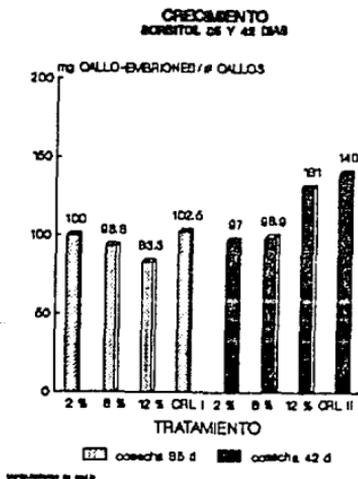


Fig. No. 58. Indices de crecimiento expresados en mg de callos con embriones/# de callos, para los tratamientos de sorbitol a 2,8 y 12 % de las cosechas correspondientes a los 35 y 42 días de cultivo

En esta manipulación de medio, para todas las concentraciones probadas, se obtuvieron índices de crecimiento ligeramente menores a los obtenidos en el lote control, decrecientes a medida que la concentración se incrementa, como en el caso de la cosecha a 35 días (donde se observa una disminución de 100 a 83.3 mg de callo/# de callos) y crecientes en relación a la concentración en el caso de la cosecha de 42 días (donde aumenta de 97 a 131 mg de callo/# de callos), esto indica que efectivamente hay generación de ES durante el cultivo aunque en pequeñas cantidades y que estos embriones no contribuyen en gran proporción al peso. También podemos considerar que estos índices bajos reflejan una menor proliferación de la masa callosa dado por el fuerte estrés osmótico en el que se encuentran.

Cabe señalar que la concentración de 2 % dió resultados interesantes que pueden ser mejorados con concentraciones de 1 al 5 % con intervalos de 1 a 0.5 % en la concentración y exponiendo el tejido durante períodos más breves (2 a 4 días) o por pulsos de 1 a 2 días de duración durante la 4a. semana del cultivo.

#### V.7.1.4. GERMINACION:

Una medida de la cantidad de los embriones somáticos y de la normalidad de su fisiología, son los índices de germinación los cuales fueron evaluados después de 15 semanas de haber sido transferidos al medio de germinación. Los resultados para estos tratamientos se muestran en la Fig. No. 59.

En la germinación de los ES sometidos a los tratamientos de sorbitol de 2 %, 8 % y 12 %, del día de cultivo 28 al 35, se observó que la germinación se inició muy tardíamente e inclusive hasta el último momento de la evaluación (15 semanas), se encontraron plántulas muy jóvenes aunque de apariencia normal. Muchos de los embriones de estos ensayos revirtieron a callo en el medio de germinación, disminuyendo mucho los índices de este parámetro.

El efecto de las diferentes concentraciones sobre los índices de germinación de los cultivos de 35 días, no es muy evidente, pues sólo se observa una fuerte baja (26.09 %), en los embriones del tratamiento al 8 %, en tanto que en los tratamientos al 2 y 12 %, los índices fueron de 35.71 % y de 47.06 % respectivamente. De estos resultados podemos presumir que el sorbitol no causa un efecto nocivo en la fisiología de los embriones, pues son capaces de germinar y formar plántulas sanas. Es importante además señalar que la germinación tan tardía es también un reflejo de que se inhibió en cierta medida la germinación precoz de los ES, los cuales requirieron de más tiempo para germinar.

**% DE GERMINACION DE ES  
TRATAMIENTOS DE SORBITOL 35 Y 42 Dias.**

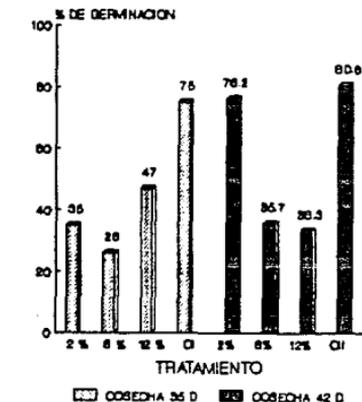


Fig. No. 59. Indices de germinación de los ES cultivados en medio de desarrollo suplementado con sorbitol al 2, 8 y 12 %, correspondientes a las cosechas de 35 y 42 días de cultivo, referidos a su control.

En relación a los embriones obtenidos después de ser cultivados en el medio con las diferentes concentraciones de sorbitol, del día 35 al 42, se observó que también en este caso la germinación fue tardía al igual que en el tratamiento anterior, sin embargo en éste es más evidente el efecto de cada concentración sobre la morfología de las plántulas formadas. En el caso de la concentración del 2 % que tuvo el mayor índice de germinación (85.71 %), se obtuvieron plántulas muy pequeñas con hojas delgadas y de color verde oscuro, de apariencia hidratada y de tallos débiles. Al parecer esta concentración aplicada en los últimos días del desarrollo no es muy conveniente, ya que si bien los rendimientos en la germinación son altos, no se obtienen plántulas de apariencia normal que requieren por lo demás de mucho cuidado en la fase de transferencia de in vitro a las condiciones de invernadero.

Para la concentración al 8 %, se observó que muchos de los embriones obtenidos revirtieron a callo, sin embargo los que quedaron (35.71 %), dieron origen a plántulas pequeñas de apariencia normal. También en este caso la germinación fue tardía. El tamaño de estas plántulas es un reflejo de la condición de déficit hídrico en que se desarrollaron los embriones.

En el tratamiento al 12 % hubo también muchos embriones que revirtieron a callo y si bien el índice de germinación es bajo (33.3 %), las plántulas obtenidas fueron pequeñas pero de apariencia normal.

En general en todos estos tratamientos, se observó que las plantas obtenidas requieren de cuidados para su transferencia a tierra y si bien no es una característica deseable, quizá pueda ser controlada.

#### V.7.1.5. % PESO DE LAS FRACCIONES EMBRIONARIAS:

Los resultados de la evaluación del peso fresco de los embriones somáticos cultivados en presencia de sorbitol y obtenidos a diferentes tiempos de cultivo, se muestran a continuación en la Fig. No. 60.

TRATAMIENTO	F90	F70	F50	F30	SUP.
2 %	24.34	26.11	26.92	23.62	
8 %	36.91	33.6	29.49		
12 %	30.33	34.81	34.85		
CONTROL	18.83	19.85	18.75	25.62	16.94

Fig. No. 60. Peso fresco expresado en %, para los diferentes estadios embrionario F90 (estadio globular y corazón, F70 (estadio torpedo), F50 (torpedo maduro), F30 (cotiledonar), para las cosechas de los tratamientos de sorbitol a concentraciones de 2, 8 y 12 %, a los 35 días de cultivo.

**% PESO DE FRACCIONES EMBRIONARIAS  
SORBITOL 35 DIAS**

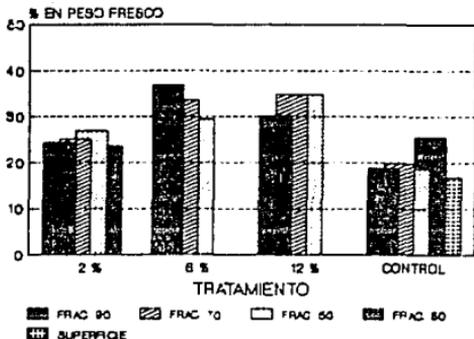


Fig. No. 61 Peso fresco expresado en %, para los diferentes estadios embrionarios F90 (estadio globular y corazón, F70 (estadio torpedo), F50 (torpedo maduro), F30 (cotiledonar), para las cosechas de los tratamientos de sorbitol a concentraciones de 2, 8 y 12 %, a los 35 días de cultivo.

TRATAMIENTO	F90	F70	F50	F30	FONDO
2 %	41.90	30.84	27.26		
8 %	53.58	12.54	33.88		
12 %	17.39	11.99	17.18		53.44
CONTROL			2	98	

Fig. No. 62. Peso fresco expresado en %, para los diferentes estadios embrionarios; Fracción del fondo del gradiente, F90 (estadio globular y corazón, F70 (estadio torpedo), F50 (torpedo maduro), F30 (cotiledonar), para las cosechas de los tratamientos de sorbitol a concentraciones de 2, 8 y 12 %, a los 42 días de cultivo.

**% PESO DE FRACCIONES EMBRIONARIAS**  
SOMÁTICO AL 42 DÍAS

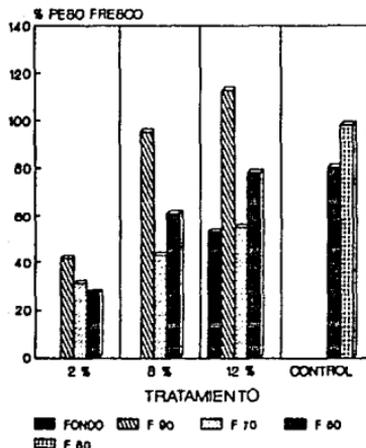


Fig. No. 63. Peso fresco expresado en %, para los diferentes estadios embrionarios; Fracción del fondo del gradiente, F90 (estadio globular y corazón, F70 (estadio torpeda), F50 (torpeda maduro), F30 (cotiledonar), para las cosechas de los tratamientos de sorbitol a concentraciones de 2, 8 y 12 %, a los 42 días de cultivo.

En estas figuras, se observa que a los 35 días de cultivo, el lote tratado con sorbitol al 2 % presenta estadios de desarrollo tempranos y casi en la misma proporción entre sí, lo cual indica que efectivamente hay generación y desarrollo de los embriones somáticos hasta los estados de desarrollo intermedios pero no hasta formas maduras o terminales como ocurre en el lote control. Al mismo tiempo que se observa que la capacidad embriogénica del cultivo es buena, es evidente que se provocó una reducción en la heterogeneidad del cultivo, pues se obtuvo una mayor sincronía en el desarrollo embrionario in vitro.

En el caso de las concentraciones a 8 y 12 % también hay menor heterogeneidad en el cultivo y las fracciones presentes corresponden a estadios muy tempranos, en éste sentido parece que el cultivo en general no se desarrolla tan rápidamente como el control; este efecto es aún más evidente en la cosecha de 42 días, en la cual se observa que los estadios de

desarrollo jóvenes están presentes en una mayor proporción que los demás y comparándolos con los  $\frac{1}{2}$ 's de los pesos de las fracciones embrionarias del control, observamos que en este caso se encuentran estadios de desarrollo muy avanzados. Así, podemos decir que el cultivo en los tratamientos con sorbitol no se encuentra en una etapa final como la del control, sino que al parecer el cultivo puede continuar generando ES y/o mantener los ES que existen, en sus estadios de desarrollo correspondientes.

Este resultado es interesante ya que es precisamente el efecto que se buscaba con esta manipulación de medio, esto es, frenar un poco el desarrollo embrionario tratando de no llegar a estadios de desarrollo más avanzados que faciliten la germinación precoz.

#### V.7.1.6. CONTENIDO DE PROTEINAS

Los niveles de albúminas y globulinas alcanzados en los embriones somáticos cultivados en medio de desarrollo suplementado con las concentraciones ya mencionadas de sorbitol de los días de cultivo 28 al 35 y del 35 al 42, al igual que las de los lotes control usados para éstos ensayos, se muestran a continuación en las Figs. No. 64 y 65.

En estas figuras se observa que los niveles de albúminas y globulinas fueron mayores en los lotes experimentales con respecto al control, tanto en los ES cultivados de los 28 a los 35 días, como en aquellos cultivados del día 35 al 42 en presencia de sorbitol.

Es también evidente la presencia de un mayor contenido de proteínas en las fracciones embrionarias II, III y IV, las cuales corresponden a los estadios de desarrollo más tempranos, los que además se presentan en una mayor proporción y al parecer se mantienen durante más tiempo, pues su velocidad de crecimiento o desarrollo es más lenta.

Este resultado es interesante porque de alguna manera se logró un incremento en el contenido de proteínas de reserva (globulinas), la cual pudo ser debida a una mayor síntesis de éstas o a su acumulación. En estas figuras también es evidente la presencia de las diferentes fracciones embrionarias y su mayor contenido de proteínas que los lotes control.

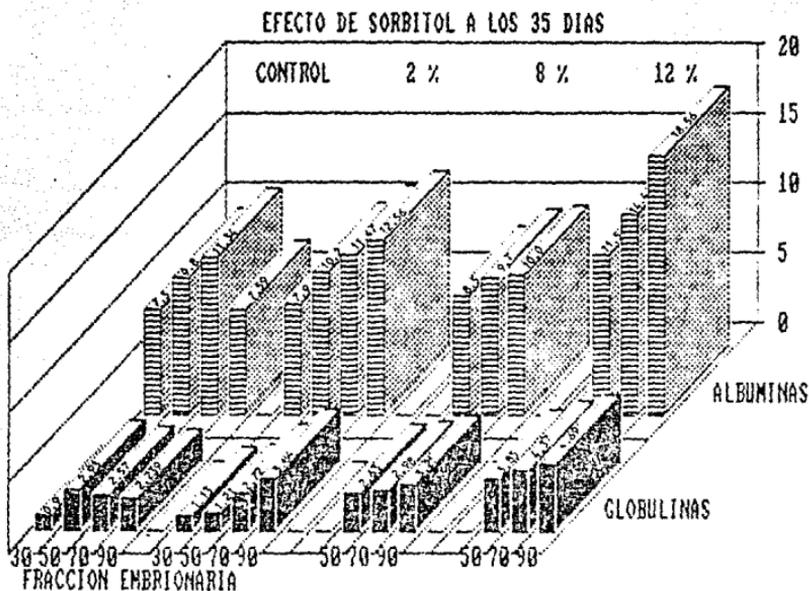


Fig.64 Comparacion de los niveles de albuminas y globulinas en mg. de proteina/g. de tejido fresco, obtenidos en fracciones de diferente densidad de ES cultivados en medio de desarrollo suplementado con sorbitol a concentraciones de 2 %, 8 % y 12 % del dia 28 al dia 35.

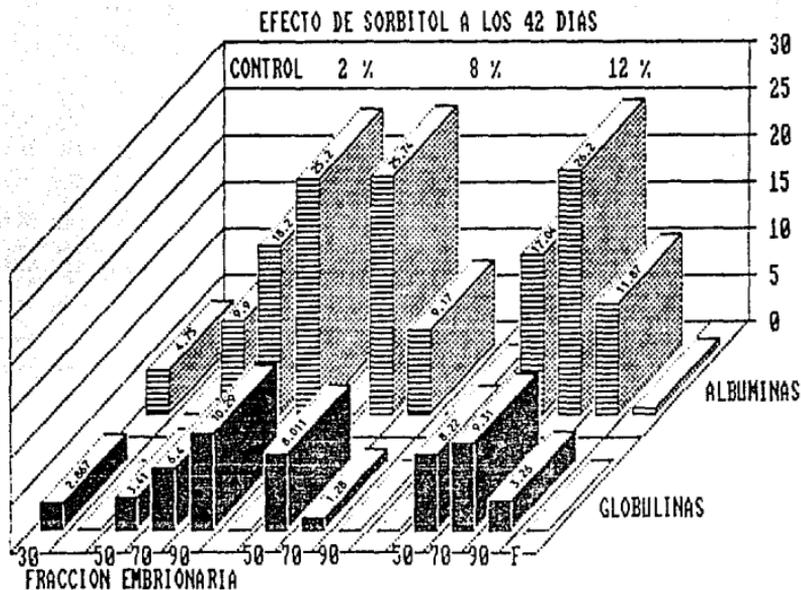


Fig. 65 Comparación de los niveles de albuminas y globulinas en mg. de proteína/g. de tejido fresco, obtenidos en fracciones de diferente densidad de ES cultivados en medio de desarrollo suplementado con sorbitol a concentraciones de 2 %, 8 % y 12 % del día 35 al día 42.

#### V.7.1.7. RELACION ALBUMINAS/GLOBULINAS

Es importante notar que el incremento en los niveles de globulinas, es acompañado por un gran incremento en los niveles de albúminas, lo que conduce a los resultados en la relación albúminas/globulinas para las cosechas de los tratamientos de sorbitol a los 35 y 42 días, que se muestran en las figuras 66 y 67.

#### RELACION ALBUMINAS/GLOBULINAS COSECHAS SORBITOL 35 d

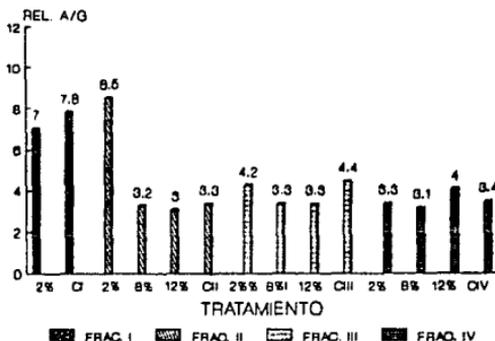


Fig. No. 66. Relaciones albúminas/globulinas de ES del tratamiento de sorbitol del día de cultivo 28 al 35, correspondientes a las fracciones de 30, 50, 70 y 90 % p/v de sacarosa del gradiente de densidad.

En estas figuras se observa que la relación A/G en las fracciones embrionarias es mayor en el tratamiento con sorbitol al 2 %, en comparación con las relaciones A/G obtenidas con el control y con las otras concentraciones de 8 y 12 %, en las cuales la relación disminuye y es menor aún que con el control.

Estos resultados indican que en los tratamientos de 8 y 12 %, las globulinas contribuyen en mayor proporción al mayor contenido de proteínas y sus niveles no se ven superados por las albúminas, como ocurre en la concentración de 2 % y en el control.

Estos mayores niveles de globulinas en los tratamientos de 8 y 12 %, sin embargo corresponden también a niveles muy altos de albúminas lo cual es un efecto no muy deseable porque en esta fracción de proteínas se cuenta con una gran cantidad de enzimas proteolíticas que podrían causar una fuerte disminución por hidrólisis de las proteínas de reserva.

RELACION ALBUMINAS/GLOBULINAS  
COSECHAS SORBITOL 42 d

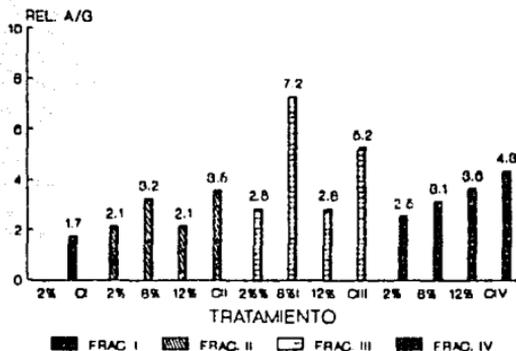


Fig. No. 67. Relaciones albúminas/globulinas de ES cultivados en medio de desarrollo suplementado con sorbitol al 2, 8, y 12 % del día de cultivo 35 al 42, correspondientes a las fracciones de 30, 50, 70 y 90 % p/v de sacarosa del gradiente de densidad.

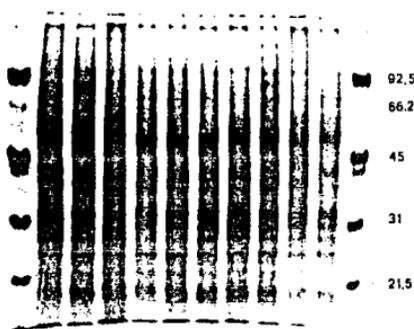
V.7.1.8. CARACTERIZACION DE LAS PROTEINAS DE RESERVA EN ES CULTIVADOS CON SORBITOL.

La identificación y la caracterización parcial de las proteínas de reserva en las fracciones de globulinas obtenidas con los diferentes tratamientos, se muestra a continuación, mediante los patrones polipeptídicos obtenidos por SDS-PAGE:

Estos patrones al ser comparados con los correspondientes de los extractos de ES cultivados en condiciones basales y con los de la semillas, revelan que hay unas bandas importantes que se presentan en éstos tratamientos y que corresponden con las características de los patrones establecidos para la semilla y para los ES.

Por otro lado, también se observa que los patrones correspondientes a la fracción de albúminas son similares a los anteriormente obtenidos con semillas y ES basales.

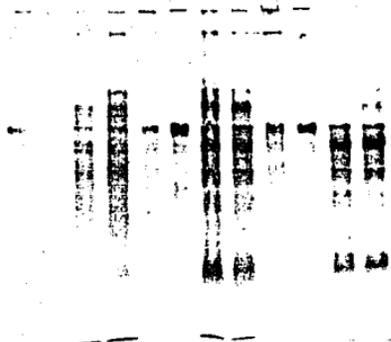
2 3 4 5 6 8 9 10 11 12 13 14



CARRIL	MUESTRA
2	Marcadores de P. M.
3	Albúminas sorbitol 2% FIV
4	Albúminas sorbitol 2% FIII
5	Albúminas sorbitol 2% FII
6	Albúminas sorbitol 2% FI
8	Albúminas sorbitol 8% FIV
10	Albúminas sorbitol 8% FIII
11	Albúminas sorbitol 8% FII
12	Albúminas sorbitol 12% FIV
13	Albúminas sorbitol 12% FIII
14	Albúminas sorbitol 12% FII

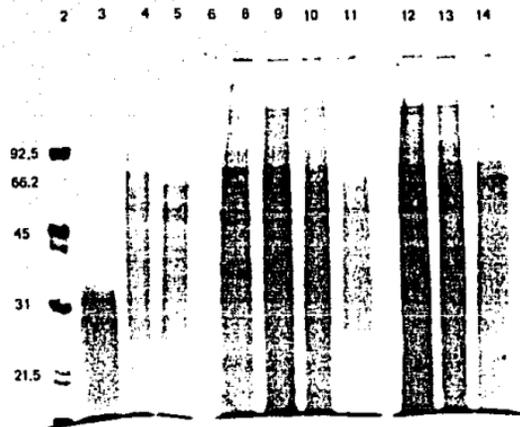
Fig. No. 68. Patrones polipeptídicos correspondientes a los extractos de albúminas de embriones somáticos cultivados en medio de desarrollo suplementado con sorbitol a las concentraciones de 2, 8 y 12 % en condiciones de fotoperíodo de los 28 a los 35 días de cultivo.

2 3 4 5 6 8 9 10 11 12 13 14



CARRIL	MUESTRA
2	Marcadores de P. M.
3	Globulinas sorbitol 2% FIV
4	Globulinas sorbitol 2%
5	Globulinas sorbitol 2% FII
6	Globulinas sorbitol 2% FI
8	Globulinas sorbitol 8% FIV
10	Globulinas sorbitol 8% FIII
11	Globulinas sorbitol 8% FII
12	Globulinas sorbitol 12% FII
13	Globulinas sorbitol 12% FIII
14	Globulinas sorbitol 12% FIV

Fig. No. 69. Patrones polipeptídicos correspondientes a los extractos de globulinas de embriones somáticos cultivados en medio de desarrollo suplementado con sorbitol a las concentraciones de 2, 8 y 12 % en condiciones de fotoperíodo de los 28 a los 35 días de cultivo.



CARRIL	MUESTRA
2	Marcadores de P. M.
3	Globulinas sorbitol 2% FII
4	Globulinas sorbitol 2% FIII
5	Globulinas sorbitol 2% FIV
6	Globulinas sorbitol 2% Botón
8	Globulinas sorbitol 8% FII
10	Globulinas sorbitol 8% FIII
11	Globulinas sorbitol 8% FIV
12	Globulinas sorbitol 12% FII
13	Globulinas sorbitol 12% FIII
14	Globulinas sorbitol 12% FIV

Fig. No. 70. Patrones polipeptídicos correspondientes a los extractos de globulinas de embriones somáticos cultivados en medio de desarrollo lio suplementado con sorbitol a las concentraciones de 2, 8 y 12% p/v en condiciones de fotoperíodo de los 35 a los 42 días de cultivo.

#### V.7.1.9. ROCKET IMMUNOELECTROFORESIS

La identidad de las globulinas (proteínas de reserva), fue confirmada mediante el Rocket inmunolectroforesis, para los extractos de globulinas de las diferentes fracciones de embriones somáticos cultivados en medio de desarrollo suplementado con sorbitol a las concentraciones de 2 ‰, y 8 ‰ p/v del día de cultivo 28 al 35, se obtuvieron los resultados que se muestran en la Fig. No. 71.

En esta placa de inmunolectroforesis se observa que los extractos de globulinas de los embriones somáticos cultivados en medio de desarrollo suplementado con sorbitol a las concentraciones de 2 y 8 ‰, presentan las proteínas de reserva específicas de las semillas de alfalfa, sobre todo en la fracción embrionaria II correspondiente al estadio de torpedo, se observan inmunoprecipitados no bien definidos debido aparentemente a una alta concentración del antígeno que no permite la formación precisa de los inmunoprecipitados, sin embargo aún cuando éstos embriones somáticos presentan la formación y acumulación de las proteínas de reserva, los parámetros de calidad del cultivo con ésta manipulación de medio son más bien desfavorables.

Para las fracciones de globulinas de los extractos de ES cultivados en medio de desarrollo suplementado con sorbitol a diferentes concentraciones del día de cultivo 35 al 42, los resultados se muestran en la Fig. No. 72. En ésta figura se muestra la altura de los inmunoprecipitados obtenidos para cada muestra, así como las concentraciones estimadas de acuerdo a la altura de los inmunoprecipitados en ng de proteínas/5 µl de muestra sin diluir.

Observando los resultados anteriores, podemos decir que se logró un incremento en los niveles de proteínas de reserva con este agente, siendo el mejor tratamiento el de 2 ‰, pues se obtuvieron niveles importantes de globulinas en fracciones que sólo se presentaron con los tratamientos con sorbitol (pues en el control, sólo se obtuvo una fracción de baja densidad correspondiente al estadio de cotiledonar), sin embargo los parámetros de crecimiento y calidad del cultivo fueron más bien bajos con relación al control, lo que representa un alto riesgo pues se pueden lograr altos niveles de proteínas a cambio de abatir la calidad del cultivo.

Por esta razón, señalamos la conveniencia de probar a las concentraciones sugeridas, variando los tiempos de cultivo con este agente, pues si bien la manipulación no arrojó resultados impactantes, se logró el objetivo de establecer las concentraciones aproximadas de trabajo para lograr resultados más favorables.

1 2 3 4 5

12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

POZO	MUESTRA
1	SORBITOL 2 X FI
2	SORBITOL 2 X FII
3	SORBITOL 2 X FIII
4	SORBITOL 8 X FII
5	SORBITOL 8 X FIII
6	
7	
8	
9	
10	
11	
12	

Fig. No. 71. Placa de Rocket Immunoelectroforéisis para los extractos de globulinas de los diferentes estadios de desarrollo embrionario, cultivados en medio de desarrollo suplementado con sorbitol a las concentraciones de 2 x y 8 x p/v del día de cultivo 28 al 35.

POZO	MUESTRA	ALTURA (cm)	COND. (mg/5 ul)
1	CTRL Embriones somáticos F I	7	473
2	Sorbitol 2 X F	10,5	1010
3	Sorbitol 2 X F	11	1038
4	Sorbitol 2 X F	9	865
5	Sorbitol 8 X F	4	384
6	Sorbitol 8 X F		
7	Sorbitol 8 X F III		
8	Sorbitol 12 X F	12,5	1202
9	Sorbitol 12 X F	10	961
10	Sorbitol 12 X F	4	384
11	Sorbitol 12 X F IV		
12	CTRL Semilla	10 y 16	1250

Fig. No. 72. Placa de Rocket Immunoelectroforéisis para los extractos de globulinas de los diferentes estadios de desarrollo embrionario, cultivados en medio de desarrollo suplementado con sorbitol a las concentraciones de 2 x y 8 x p/v del día de cultivo 28 al 35.

### V.7.2. RESULTADOS ACIDO ABCISICO

En esta manipulación de medio, se suplemento el medio de desarrollo con ácido abscísico a una concentración única de  $10^{-5}$  M, los embriones somáticos fueron cultivados en presencia de este agente en condiciones de oscuridad de los días de cultivo 28 al día 35 y del 35 al 42. Los resultados obtenidos para cada uno de los parámetros evaluados y el análisis de los mismos se presenta a continuación:

#### V.7.2.1. RESPUESTA:

Este parámetro fue evaluado de la misma manera que en los tratamientos de sorbitol, esto es, se consideró como una estimación indirecta de la cantidad de callos que presentaron formación de ES. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. No. 73.

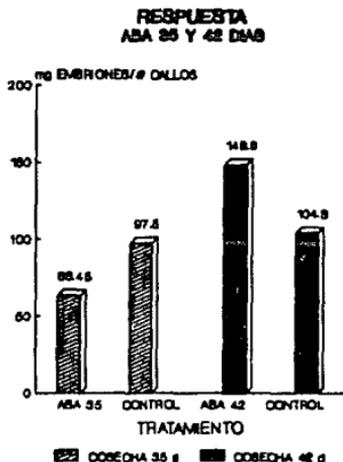


Fig. No. 73. Indices de respuesta expresados en mg de embriones/# de callos, para los tratamientos de ABA  $10^{-5}$  M de las cosechas correspondientes a los 35 y 42 días de cultivo

Como se observa en la tabla y en la gráfica anteriores, la respuesta en el tratamiento de ABA-I (35 días de cultivo), fue menor en un 8.53 % con respecto al control, sin embargo en el tratamiento de ABA-II (42 días de cultivo), la

respuesta se incrementó y superó al control hasta en un 173.7 %, éstos resultados indican que la formación y proliferación de estos callos no se vió afectada de manera negativa, sino que más bien se provocó una mejor callogénesis, la formación y desarrollo de los ES, tampoco se abatió drásticamente aunque aparentemente se cuenta con pocos embriones por callo, como indican los bajos niveles de rendimiento.

#### V.7.2.2. RENDIMIENTO:

Al igual que en los tratamientos de sorbitol, para los cultivos con ABA, éste parámetro fue evaluado indirectamente durante el tratamiento mediante el cambio en peso fresco de los embriones somáticos, por cada gramo de callo, como una medida útil para determinar la formación y crecimiento de los embriones somáticos en el cultivo in vitro. Los resultados de los ensayos con ABA se presentan en la Fig. No. 74.

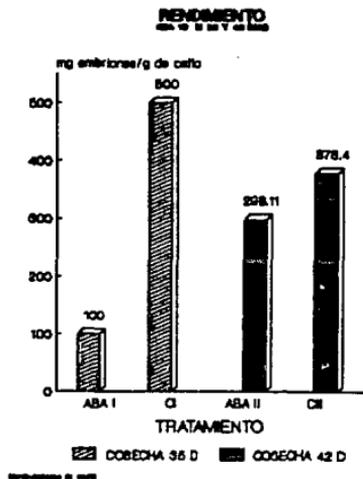


Fig. No.74. Indices de rendimiento expresados en mg de embriones/g callo, para los tratamientos de ABA  $10^{-5}$  M de las cosechas correspondientes a los 35 y 42 días de cultivo

En éstos resultados se observa que el rendimiento en los lotes experimentales, fue menor en un 80 % en el tratamiento ABA-1 con respecto al control de 35 días y en un 21.22 % para

el tratamiento ABA-2 con relación al control de 42 días. Sin embargo, es interesante señalar que en el lote control, el rendimiento disminuye a los 42 días, en un 24.32 % en tanto que en la presencia de ABA el rendimiento se incrementa a este mismo tiempo de cultivo en un 198 %, éste efecto puede atribuirse a que los embriones somáticos de el lote experimental incrementan su peso por unidad de biomasa y no a una nueva generación de embriones, ya que en la tabla correspondiente a los %'s de peso de las diferentes fracciones embrionarias durante el cultivo, se observa que no hay una aportación de peso debida a la presencia de embriones somáticos en etapas tempranas de desarrollo. En el caso de el lote control correspondiente al ensayo de 42 días, se observa que tampoco hay generación de ES, sin embargo hay una importante generación de ES en el estadio de desarrollo cotiledonar que provoca índices de rendimiento altos.

Estos resultados indican que la proliferación y el crecimiento de los embriones fueron limitados por el ABA, sin embargo esto no involucra una merma importante en la formación de los mismos, ya que es posible encontrar todos los distintos estadios embrionarios en estos cultivos y cada uno de ellos en buena proporción (de 8 a 25 %). Las diferencias en los niveles alcanzados con el control y con el lote experimental, pueden entonces deberse a algún efecto nocivo en el desarrollo causado por la concentración utilizada de ABA o por el tiempo de exposición en el cultivo.

#### V.7.2.3. CRECIMIENTO:

También este parámetro fue evaluado indirectamente como en el caso del sorbitol, y de igual manera, fue utilizado para conocer el cambio en peso fresco de los callos con embriones somáticos durante el desarrollo embrionario. Los resultados obtenidos en nuestros cultivos, se muestran en la Fig. No. 75.

En este parámetro, se observa el mismo efecto que en el caso de la respuesta, observándose un mayor crecimiento en el tratamiento de ABA-II, con respecto a su control (54.9 %) y con el tratamiento de ABA-I (215.2 %), lo que hace suponer que aplicado durante la fase final del desarrollo, el crecimiento es favorecido con el tratamiento utilizado en condiciones de oscuridad. Los resultados en este parámetro también indican que hay una buena formación de callos y que los embriones presentes pueden incrementar notablemente su peso.

## CRECIMIENTO ABA 35 Y 42 DIAS

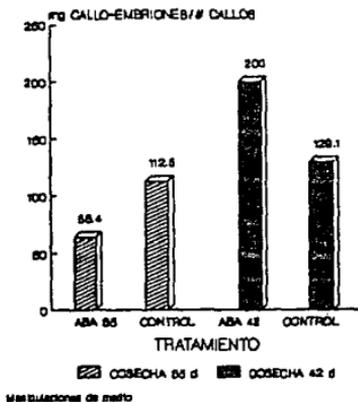


Fig. No. 75. Indices de crecimiento expresados en mg de callos con embriones/# de callos, correspondientes a los lotes de ES cultivados en medio de desarrollo suplementado con ABA  $10^{-5}$  M del día de cultivo 28 al 35 y del día 35 al 42.

### V.7.2.4. GERMINACION:

Los resultados obtenidos en la germinación de los ES cultivados con éste tratamiento, fueron muy importantes y determinantes ya que demuestra la gran alteración fisiológica causada por este agente en los ES en cultivo. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. No. 76.

Como se muestra en dicha figura, se abatió casi totalmente la capacidad de los embriones para germinar, obteniéndose niveles de germinación de 0 %, durante las primeras 15 semanas de evaluación para los tratamientos de ABA-I y ABA-II. Por lo que se consideró que estos resultados anulaban totalmente la utilidad del ABA a la concentración de  $10^{-5}$  M y su empleo en el cultivo in vitro de los embriones somáticos en desarrollo bajo condiciones de oscuridad. Sin embargo, se realizó una segunda evaluación a las 17 semanas de cultivo en medio de germinación en la que se observó que inesperadamente algunos de los embriones del tratamiento de ABA I germinaron muy tardíamente (ABA I), si bien el % de germinación de este lote, fue muy bajo (14.8 %), fue

alentador ya que nos indicó nuevamente que a menores concentraciones o durante menos tiempo de exposición podría lograrse cultivar embriones somáticos capaces de germinar normalmente. Por otro lado, consideramos que aunque esto sucediera, los embriones obtenidos no podrían contener niveles altos de proteínas de reserva que era nuestro objetivo principal por lo que consideramos que este tratamiento no fue exitoso.

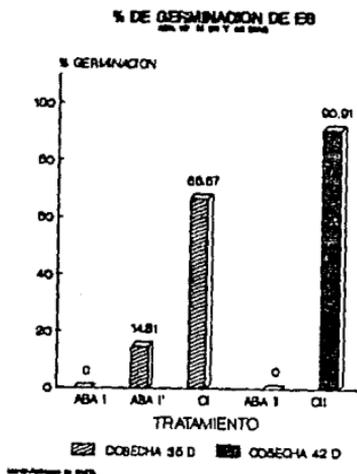


Fig. No. 76. Indices de germinación de los embriones somáticos cultivados en medio de desarrollo suplementado con ABA  $10^{-5}$  M y mantenidos en medio de germinación durante 15 semanas (ABA I) y 17 semanas (ABA I'). Los resultados corresponden a las cosechas de 35 y 42 días de cultivo.

#### V.7.2.5. % EN PESO DE LAS FRACCIONES EMBRIONARIAS:

El cambio en el % el peso fresco de las diferentes fracciones embrionarias presentes, así como la contribución de cada una de éstas en el peso total del cultivo, fueron estimados para las diferentes cosechas y los resultados se muestran en las figuras No. 77 y 78.

**% PESO FRESCO DE LOS DIFERENTES ESTADIOS DE DESARROLLO**

**35 Y 42 DIAS**

TRATAMIENTO	F90	F70	F50	F30	FONDO
ABA I	19.60	22.22	25.22	12.97	17.52
CONTROL	18.83	19.85	18.75	25.62	
ABA II	7.99	6.89	16.62	26.85	17.27
CONTROL		6.60	6.88	86.52	

Fig. No. 77. Peso fresco expresado en %, para los diferentes estadios embrionario F90 (estadio globular y corazón, F70 (estadio torpedo), F50 (torpedo maduro), F30 (cotiledonar) para las cosechas de los tratamientos de ABA  $10^{-5}$  M a los 35 (ABA I) y 42 (ABA II) días de cultivo.

**% PESO DE LAS FRACCIONES EMBRIONARIAS**  
ABA 35 Y 42 DIAS

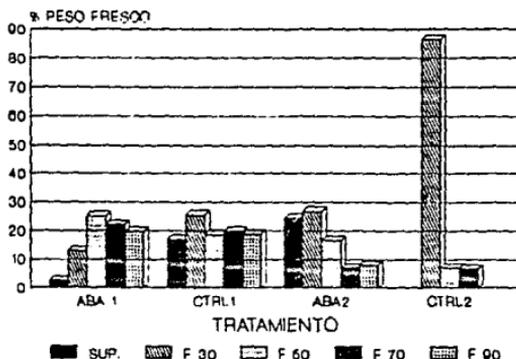


Fig. No. 78. Peso fresco expresado en %, para los diferentes estadios embrionario F90 (estadio globular y corazón, F70 (estadio torpedo), F50 (torpedo maduro), F30 (cotiledonar) y la fracción del fondo, correspondientes a las cosechas de los tratamientos de ABA  $10^{-5}$  M a los 35 (ABA 1) y 42 (ABA 2) días de cultivo.

Un resultado muy evidente en éstas figuras, es la gran heterogeneidad de estadios de desarrollo durante el cultivo in vitro, que es muy clara en los lotes de ABA a los 35 y 42 días y en el lote control a los 35 días.

Así en nuestros resultados podemos observar que en los tratamientos con ABA, al igual que en lote control de 35 días, se presentan casi todos los estadios de desarrollo embrionario y en el caso de ABA-1 hay una pequeña proporción de ES en estadio cotiledonar y mayores proporciones de ES en estadio globular-corazon y torpedo, esto es, estadios de desarrollo juveniles. En comparación con el lote control, observamos que éste muestra un estadio de desarrollo avanzado y los %'s de peso de cada uno de los estadios de desarrollo, se encuentran casi en la misma proporción.

En el tratamiento a los 42 días, el cultivo en general se encuentra en una etapa terminal, habiendo una mayor proporción de estadios de desarrollo avanzado, en tanto que el control de este tratamiento muestra una gran cantidad de ES en estadios de torpedo maduro, pero aún no en estadio cotiledonar.

La inhibición del crecimiento con este agente no fue tan clara como en el caso del sorbitol, pues la tendencia del cultivo no es hacia la inhibición de la germinación precoz, ya que se alcanzan estadios de desarrollo avanzados antes que en el control, sin embargo es necesario señalar que diversos factores afectan el desarrollo en condiciones basales, pues en ensayos anteriores; a éste tiempo puede encontrarse el término de desarrollo embrionario en condiciones basales y en éste tratamiento en particular, el lote control mostró un ligero retraso.

#### V.7.2.6. CONTENIDO DE PROTEÍNAS:

El contenido de proteínas, en especial de las globulinas fue uno de los parámetros críticos a evaluar en cada una de las manipulaciones de medio, ya que es una medida de nuestro principal objetivo que fue incrementar la acumulación de éstas proteínas en los lotes experimentales, con relación a los niveles obtenidos en los lotes control. Con la aplicación de ácido abscísico al medio de cultivo, se encontraron los resultados de las Figs. No. 79 y 80.

Como muestran dichas figuras, en la cosecha a 35 días se obtuvieron índices de albúminas y globulinas superiores (hasta a 16 mg de proteína por g de tejido), a los observados en el lote control a éste tiempo de cultivo. Si bien en el caso de las globulinas, las diferencias son pequeñas (aprox. 5 mg de proteína/g de tejido), es interesante señalar que los

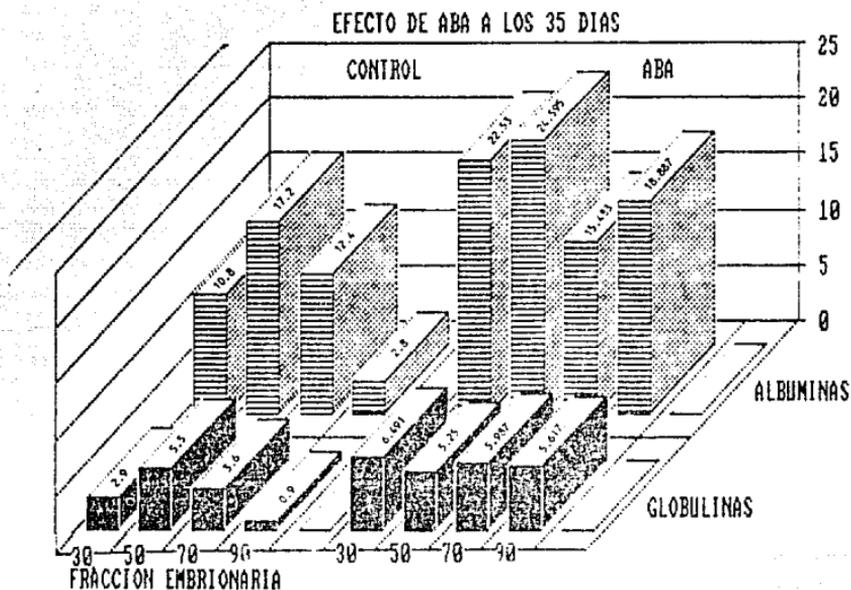


Fig. 79 Comparación de los niveles de albúminas y globulinas en mg. de proteína/g. de tejido fresco, obtenidos en fracciones de diferente densidad de ES cultivados en medio de desarrollo, suplementado con ABA  $10^{-6}$  M del día 29 al día 35 en condiciones de oscuridad.

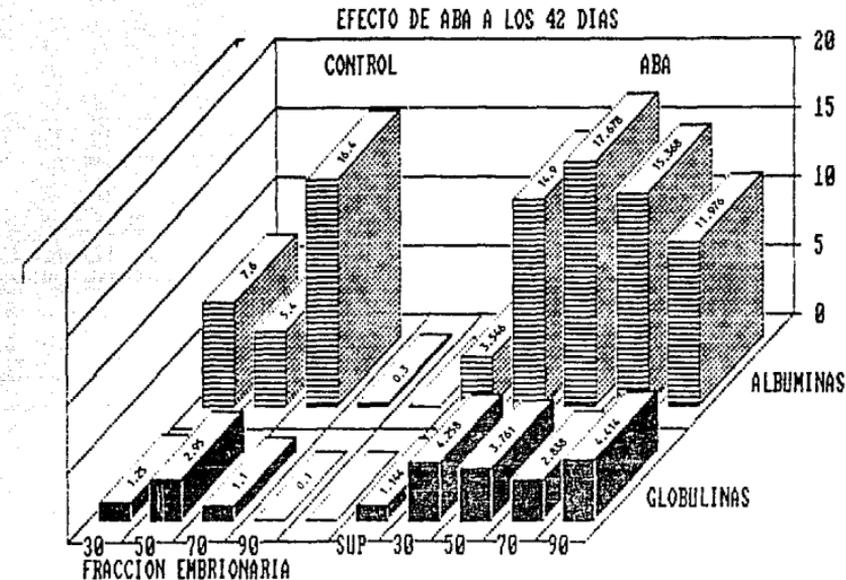


Fig. 80 Comparación de los niveles de albúminas y globulinas en mg. de proteína/g. de tejido fresco, obtenidos en fracciones de diferente densidad de ES cultivados en medio de desarrollo, suplementado con ABA  $10^{-8}$  M del día 35 al día 42 en condiciones de oscuridad.

niveles de globulinas se mantienen casi iguales en todos los estadios de desarrollo y no disminuyen hacia los estadios de desarrollo más avanzados, este efecto es un indicativo de que las proteínas sintetizadas no se están perdiendo por hidrólisis o por algún factor que no permita su acumulación. Es muy importante señalar que hacia el final del desarrollo embrionario, los niveles de globulinas no decaen fuertemente como en el control, lo cual es muy favorable.

En el caso de la cosecha a los 42 días, se observa un comportamiento más regular en los niveles de albúminas, los cuales se incrementan progresivamente hasta los estadios de desarrollo intermedio (hasta 12 mg de proteína/g de tejido) y posteriormente decrecen en los últimos estadios embrionarios, este decremento también ocurre en los niveles de globulinas de los embriones anormales (fracción 0), sin embargo desde la fracción IV (90 %) a la I (30 %), encontramos casi el mismo contenido de globulinas, el cual es mayor que en el control de esta cosecha (aprox. 3 mg de proteína/g de tejido). Este resultado es interesante ya que no hay pérdida de globulinas, pero aún debemos saber a que proteínas específicamente esta siendo debida la constancia en los niveles de las mismas.

#### V.7.2.7. RELACION ALBUMINAS/GLOBULINAS:

La relación entre los niveles de las dos principales fracciones proteicas (albúminas y globulinas), se obtuvo para cada cosecha, los resultados se muestran las Figs. No. 81 y 82.

TRATAMIENTO	F90	F70	F50	F30	FONDO
ABA I	3.36	2.59	4.68	3.47	4.20
CONTROL	3.11	3.44	3.13	3.72	
ABA II	2.71	5.41	4.7	3.50	4.23
CONTROL	3.0	14.91	1.83	6.08	

Fig. No. 81. Relaciones albúminas/globulinas de los diferentes estadios embrionarios de ES cultivados en medio de desarrollo suplementado con ABA  $10^{-5}$  M en las cosechas correspondientes a los 35 (ABA I) y 42 (ABA II) días de cultivo.

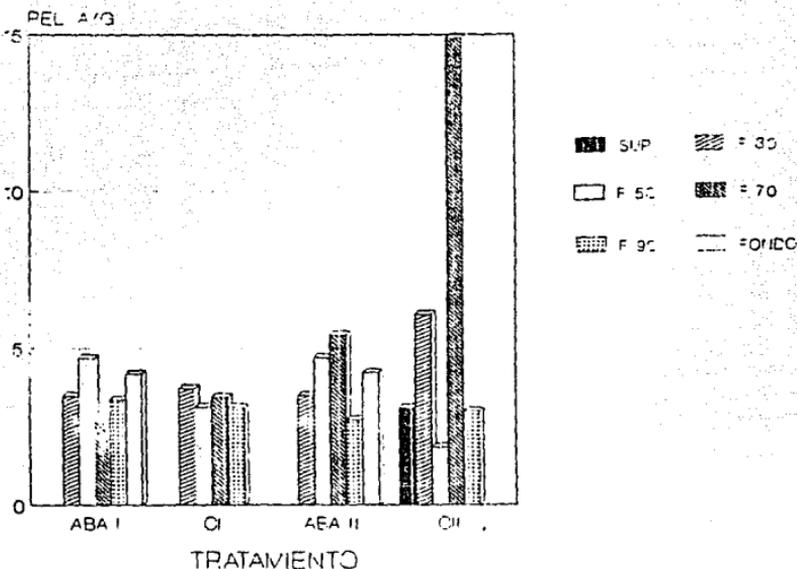


Fig. No. 82. Comparación de los niveles obtenidos en la relación albúminas/globulinas de los diferentes estadios embrionarios de ES cultivados en medio de desarrollo suplementado con ABA  $10^{-5}$  M en las cosechas correspondientes a los 35 (ABA I) y 42 (ABA II) días de cultivo.

Como se observa en los resultados anteriores, la relación A/G para el tratamiento de ABA-I, fue en general mayor a la obtenida en el lote control, lo cual indica que con este tratamiento, hay una mayor síntesis de albúminas que de globulinas durante la fase inicial del desarrollo embrionario; sin embargo, en la cosecha del tratamiento de ABA-II, se observa que la relación A/G incrementa un poco con relación a la obtenida en ABA-I, pero es mucho menor que la obtenida en el lote control correspondiente, este resultado evidencia que la síntesis de albúminas y/o globulinas, se incrementa notablemente en los ES cultivados en condiciones basales, hacia el final del desarrollo embrionario; esto no sucede con el lote experimental en el que la relación albúminas/globulinas no alcanza niveles tan altos. De alguna manera, se puede decir entonces, que con este tratamiento se logró una pequeña inhibición en la síntesis de albúminas, o bien que se logró un efecto permisivo en el incremento de los niveles de globulinas.

#### V.7.2.8. CARACTERIZACION DE LAS PROTEINAS DE RESERVA EN ES CULTIVADOS CON ABA $10^{-5}$ M

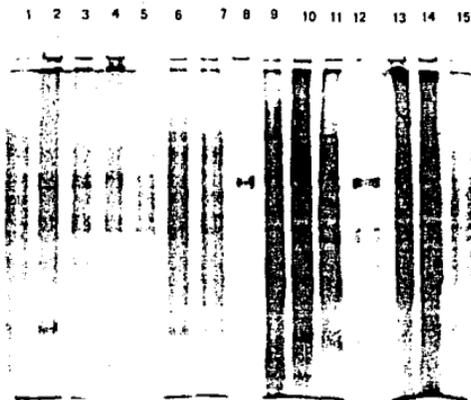
La identificación y la caracterización parcial de las proteínas anteriormente cuantificadas se realizó por electroforesis en geles de poliacrilamida y SDS-PAGE, en estos ensayos se obtuvieron los resultados que se muestran en las Figs. No. 83 y 84.

En los geles de dichas figuras, observamos que los patrones característicos de las globulinas de los embriones somáticos cultivados en medio de desarrollo suplementado con ABA  $10^{-5}$  M en oscuridad presentan diferencias en la composición y P. M. de los polipéptidos obtenidos, con respecto a las globulinas de semillas de alfalfa y a las de ES cultivados en medio de desarrollo basal, lo que sugiere que aparentemente las proteínas obtenidas con esta manipulación de medio no son las de nuestro interés y lo que también evidencia que esta manipulación de medio no es adecuada para los propósitos de esta investigación, sin embargo se realizó el "Rocket" inmunolectroforesis para confirmar si efectivamente las proteínas presentes no eran identificadas por el anticuerpo.

#### V.7.2.9. ROCKET INMUNOELECTROFORESIS

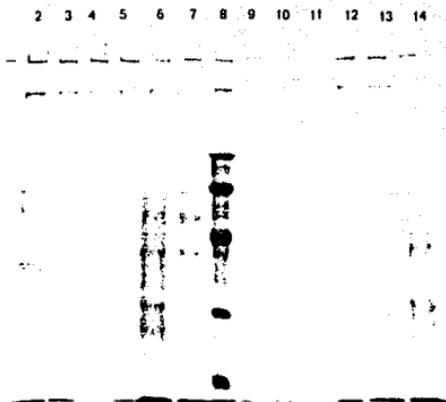
Los análisis de las globulinas por "Rocket" inmunolectroforesis, dieron como resultado las placas que se observan en las Figs. No. 85 y 86, en las que se observa que los inmunoprecipitados formados son muy pequeños, lo que demuestra que la cantidad presente de proteínas de reserva específicas es pequeña. Además se observa la presencia de inmunoprecipitados grandes que no están totalmente formados y cuya intensidad es baja, éstos inmunoprecipitados parecen corresponder a la presencia e incremento en concentración de una de las subunidades componentes de la 7S, éste resultado ya ha sido citado por otros autores que mencionan que el ABA induce a un incremento en la síntesis de la subunidad  $\beta$  de la 7S de semillas de soja (Bray and Beachy, 1985).

Este resultado es interesante ya que si se estimuló un incremento probablemente de esta subunidad en las proteínas de los ES, sin embargo, dado que la concentración de las demás subunidades es pequeña y a que los parámetros de calidad del cultivo son deficientes, confirmamos que esta manipulación no es adecuada en las condiciones experimentales probadas.



CARRIL	MUESTRA
1	Globulinas ABA c/dil F I
2	Globulinas ABA c/dil F II
3	Globulinas ABA c/dil F III
4	Globulinas ABA c/dil F IV
5	Albuminas s/dil F I
6	Albuminas ABA s/dil F II
7	Albuminas ABA s/dil F III
8	Marcadores de P. M.
9	Albuminas s/dil F I
10	Albuminas s/dil F II
11	Albuminas s/dil F III
12	Albuminas s/dil F IV
13	Albuminas c/dil F I
14	Albuminas c/dil F II
15	Albuminas c/dil F III

Fig. No. 83. Patrones polipeptídicos correspondientes a los extractos sin dilución y con dilución 1:10 de albuminas y globulinas de ES cultivadas en medio de desarrollo suplementado con ABA  $10^{-5}$  M en condiciones de oscuridad de los 28 a los 35 días de cultivo.



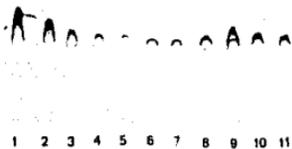
CARRIL	MUESTRA
2	Albuminas ABA F Cello
3	Albuminas ABA F 0
4	Albuminas ABA F I
5	Albuminas ABA F II
6	Albuminas ABA F III
7	Albuminas ABA F IV
8	Marcadores de P. M.
9	Globulinas ABA F Cello
10	Globulinas ABA F 0
11	Globulinas ABA F I
12	Globulinas ABA F II
13	Globulinas ABA F III
14	Globulinas ABA F IV

Fig. No. 84. Patrones polipeptídicos correspondientes a los extractos de albuminas y globulinas de ES cultivadas en medio de desarrollo suplementado con ABA  $10^{-5}$  M en condiciones de oscuridad de los 35 a los 42 días de cultivo.



POZO	MUESTRA
1	CTRL Semilla 156 ng
2	CTRL Semilla 312 ng
3	ABA -I F I
4	ABA -I F II
5	ABA -I F III
6	ABA -I F IV
7	ABA -I F V
8	ABA -I F D
9	Globulinas 90 % osc. 21 d.
10	Globulinas 90 % fotop. 21 d.
11	Globulinas 70 % fotop. 21 d.
12	Globulinas 50 % fotop. 21 d.

Fig. No. 85. Placa de "Rocket" inmunoelectroforesis para las fracciones de globulinas de los extractos de ES cultivados en medio de desarrollo suplementado con ABA  $10^{-5}$  M en condiciones de oscuridad del día de cultivo 28 al 35 F I (estado corazón-globular), F II (torpedo joven), F III (torpedo maduro, F IV (torpedo tardío), F V (cotiledonar) y F D (embriones anormales).



POZO	MUESTRA
1	CTRL Semilla 625 ng
2	CTRL Semilla 312 ng
3	CTRL Semilla 156 ng
4	CTRL Semilla 78 ng
5	CTRL Semilla 39 ng
6	ABA-2 F VI
7	ABA-2 F V
8	ABA-2 F IV
9	ABA-2 F III
10	ABA-2 F II
11	ABA-2 F I
12	ABA-2 F D

Fig. No. 86. Placa de "Rocket" inmunoelectroforesis para las fracciones de globulinas de los extractos de ES cultivados en medio de desarrollo suplementado con ABA  $10^{-5}$  M en condiciones de oscuridad del día de cultivo 35 al 42 F I (estado corazón-globular), F II (torpedo joven), F III (torpedo maduro, F IV (torpedo tardío), F V (cotiledonar) y F D (embriones anormales).

### V.7.3. RESULTADOS CON EXTRACTO DE EMBRIONES SEXUALES IMMADUROS (EEC).

Como se mencionó en la sección de materiales y métodos, la preparación de los medios de cultivo para esta manipulación de medio, involucró la esterilización por autoclave (para la mitad del lote de medio de cultivo), y por filtración a través de membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  (para la otra mitad del lote), este último procedimiento fue lento, debido a que se requiere de un gran número de filtraciones, primero a través de membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  y después a través de membranas de 0.22  $\mu\text{m}$ , hasta la obtención de un filtrado claro, el cual era adicionado en condiciones asépticas al medio de cultivo basal recién esterilizado por autoclave.

Podemos decir que el tratamiento utilizado para la preparación de los medios de cultivo fue adecuado, pues se tuvieron índices de contaminación muy bajos y más bien debidos a errores en la manipulación del material vegetativo.

Los resultados obtenidos con los lotes de este tratamiento se discuten a continuación.

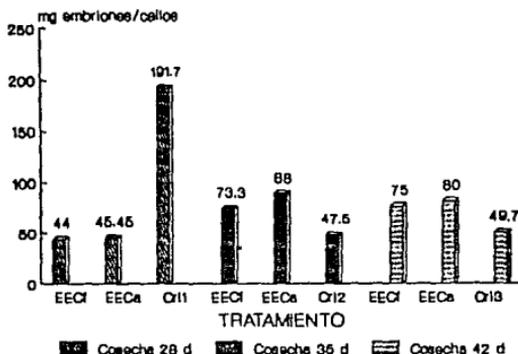
#### V.7.3.1. RESPUESTA:

Al igual que en los tratamientos de sorbitol y ácido abscísico, este parámetro fue evaluado para cada uno de los lotes experimentales y sus lotes control correspondientes, los resultados obtenidos se muestran en la Fig. No. 87.

Como es posible observar en la figura mencionada, los índices de respuesta obtenidos con esta manipulación de medio para la cosecha a los 28 días, muestran que el medio de cultivo suplementado con EEC causó un decremento de 76.3 % en el tratamiento de autoclave y de 77.05 % en el tratamiento de filtración con respecto al control, sin embargo en las cosechas a los 35 y 42 días, se observa que los lotes experimentales superaron al control en aprox. un 55 % a los 35 días y en aprox. 64 % a los 42 días. El incremento de la respuesta de los lotes experimentales a los 35 días (88 vs. 73.3 mg de embriones/# de callos) y 42 días (80 vs. 75 mg de embriones /# de callos), demuestra que el tratamiento de esterilización por autoclave fue ligeramente más favorable que el tratamiento de esterilización por filtración, sin embargo las diferencias en los resultados son muy pequeñas y podemos decir que ambos tratamientos son igualmente favorables.

En la evaluación de este parámetro es evidente también que los resultados con esta manipulación de medio fueron más satisfactorios que los obtenidos con los ensayos de sorbitol y ácido abscísico.

**RESPUESTA EEC autoc. y fil.**  
28, 35 Y 42 DIAS



**Fig. No. 87.** Niveles de respuesta, expresados en mg de embriones/# de callos del tratamiento de extracto de embriones sexuales inmaduros a una concentración de 2 g/l, para las cosechas a los 28, 35 y 42 días de cultivo. (EECf) Extracto de embriones cigóticos esterilizado por filtración, (EECa) Extracto de embriones cigóticos esterilizado por autoclave, (CrI) Control.

**V.7.3.2. RENDIMIENTO:**

La evaluación de este parámetro en los lotes experimentales y en el lote control, se realizó de manera similar a los tratamientos de sorbitol y ácido abscísico.

Los resultados se presentan en la Fig. No. 88, en la que se observa que en este parámetro se obtuvieron resultados diferenciales para los tratamientos de esterilización por autoclave y filtración.

El rendimiento en el lote cultivado en medio de desarrollo suplementado con EEC esterilizado por filtración, disminuye progresivamente en el tiempo (desde 395.40 hasta 375.0 mg de embriones/g de callo), con respecto al lote control. En tanto que en el tratamiento de autoclave, hay un efecto contrario, ya que se observa un incremento progresivo en los índices de este parámetro en las cosechas de 28, 35 y 42 días que va desde 266.7 hasta 342.8 mg de embriones/g de callo.

En cuanto al lote control, se observa que sus rendimientos siguen siempre el mismo comportamiento, esto es, rendimientos pequeños al inicio del desarrollo, mayores en los estadios de desarrollo intermedio (donde alcanzan los máximos rendimientos del cultivo - 455.2 mg de embriones/g de callos-) y que disminuyen nuevamente en los estadios de desarrollo más avanzados.

Para estos ensayos con EEC de filtración, se obtuvieron mayores índices de rendimiento para la cosecha de 28 días que en su control; sin embargo en las cosechas a 35 y 42 días, no se superó al control. Si bien, estas diferencias en los datos existen, se puede decir que el abatimiento en rendimiento no fue tan evidente como en las otras manipulaciones de medio.

Los rendimientos obtenidos para este tratamiento fueron satisfactorios, pues son evidencia de que los tratamientos no afectaron negativamente el desarrollo embrionario in vitro.

#### RENDIMIENTO EEC aut. y fil. 28, 35 Y 42 DIAS

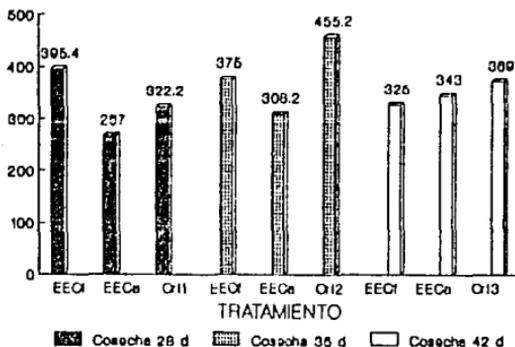


Fig. No. 88. Niveles de rendimiento expresado en mg de embriones/g de callo de los lotes de ES cultivados en medio de desarrollo suplementado con 2 g/l de extracto de embriones sexuales inmaduros, para las cosechas a los 28, 35 y 42 días de cultivo. (EECf) Extracto de embriones cigóticos esterilizado por filtración, (EECa) Extracto de embriones cigóticos esterilizado por autoclave, (CrI) Control.

### V.7.3.3. CRECIMIENTO:

El crecimiento del cultivo con estos tratamientos de EEC y de su lote control, se muestra en la Fig. No. 89, en donde se observa que el crecimiento en los cultivos en medio de desarrollo suplementado con EEC esterilizado por filtración y autoclave, mostraron un incremento importante (desde 12 hasta 98 %) en las cosechas de 35 y 42 días y para la cosecha de 28 días, se observa que sólo el tratamiento de autoclave superó al control (72.73 vs. 63.5 mg de callos con embriones/# de callos).

Los índices de crecimiento alcanzados en cada uno de los tratamientos experimentales también muestran diferencias como en el caso de la respuesta, sin embargo al igual que en ese caso, las diferencias son pequeñas y se puede decir que los tratamientos son igualmente favorables.

### CRECIMIENTO EEC autoc. y fil. 28, 35 Y 42 DIAS

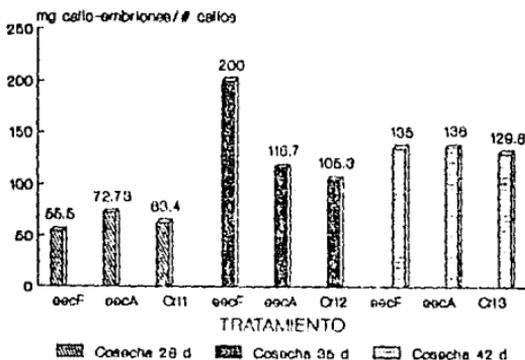


Fig. No. 89. Niveles de crecimiento expresados en mg de callo con embriones/# de callo correspondientes a los lotes de ES cultivados en medio de desarrollo suplementado con extracto de embriones sexuales inmaduros a la concentración de 2 g/l, de los días de cultivo 21 al 28, del 28 al 35 y del 35 al 42. (eecF) Extracto de embriones cigóticos esterilizado por filtración, (eecA) Extracto de embriones cigóticos esterilizado por autoclave, (Cr1) Control.

El crecimiento del cultivo con EEC, para las cosechas de 28, 35 y 42 días fue en el único parámetro en el que se logró superar al control de manera evidente, durante toda la fase experimental; lo cual indica que el cultivo tuvo una mejora tanto en la proliferación del callo, como en la formación de los ES y en la naturaleza de los mismos.

Podemos decir que el crecimiento y calidad del cultivo con esta manipulación de medio, son mejores que las obtenidas en los cultivos en condiciones basales y que en los tratamientos de sorbitol y ácido abscísico.

#### **V.7.3.4. GERMINACION:**

Como ya se mencionó, este parámetro fue uno de los más importantes en la evaluación de la utilidad real de los tratamientos de manipulaciones de medio, pues es una medida que ayuda a determinar la calidad de los embriones somáticos obtenidos in vitro. Los resultados de la germinación de nuestros cultivos en medio de desarrollo suplementado con EEC a una concentración de 2 g/l, se expresaron en porcentaje y son mostrados en la Fig. No. 90.

Como se observa en la figura mencionada, los índices de germinación alcanzados con esta manipulación de medio, se incrementaron notablemente superando al control en un 6.38 % en el día de cultivo 28, en un 36.4 % en el día de cultivo 35 y en un 95.4 % en el día de cultivo 42, éste incremento progresivo en los índices de germinación, así como el hecho de que alcanzaron valores de 200 %, es justificado porque hacia el final del cultivo, se inició una segunda fase de embriogénesis que nosotros identificamos como embriogénesis adventicia o secundaria ya que se observó la formación de pequeños embriones en la región vecina a la parte basal de los embriones somáticos maduros.

De este modo, con éste tratamiento, se logró incrementar muchísimo los niveles de rendimiento y germinación, contándose además con embriones y plántulas sanas con características morfológicas bien definidas y un desarrollo rápido y normal. Muchas de éstas plántulas continuaron su desarrollo y pudieron ser transferidas a tierra y mantenidas en condiciones de invernadero.

Los resultados de germinación para esta manipulación de medio fueron muy satisfactorios (desde 108 hasta 200 % a los 35 y 42 días), ya que se demuestra que la aplicación del EEC durante el desarrollo embrionario es conveniente para obtener buena calidad en el cultivo in vitro y como se verá más tarde, lograr altas concentraciones de proteínas de reserva..

Lograr obtener estos dos factores juntos era nuestro objetivo principal, por lo que los resultados de esta manipulación de medio, se consideraron como los mejores de la fase experimental.

**% DE GERMINACION**  
EEC 28, 35 y DIAS

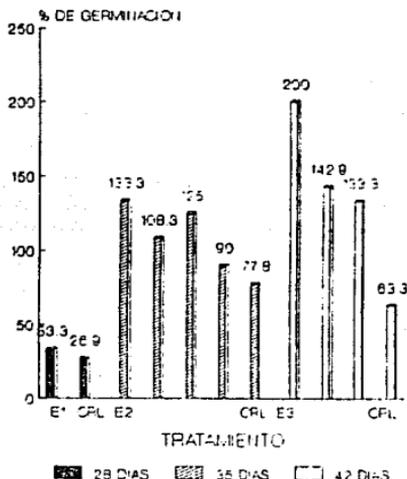


Fig. No. 90. Indices de germinación de los ES cultivados en medio de desarrollo suplementado con EEC a una concentración de 2 g/l, correspondientes a las cosechas de 28 días (E1), 35 días (E2) y 42 días de cultivo (E3), referidos a su control (CRL)

**V.7.3.5. % PESO DE LAS FRACCIONES EMBRIONARIAS**

La proporción en peso fresco de cada una de las fracciones embrionarias obtenidas por la separación en el gradiente de densidad discontinua de sacarosa, se determinó para los lotes experimentales de autoclave y filtración y en sus respectivos lotes control en las cosechas de 28, 35 y 42 días. Los resultados obtenidos se muestran en las Figs. No. 91 y 92.

En éstos resultados se observa que en general, la heterogeneidad del cultivo se incrementa con el tiempo y que en el caso de los lotes control, hay una gran proporción de embriones juveniles (est. globular y corazón) a los 28 días.

	FONDD	F90	F70	F50	F30	SUPERF.
EECA (1)		23.37	24.69	37.39	14.38	
EECA(2)			26.27	46.07	27.43	
EECA (3)	21.76	20.82	14.95	14.61	27.86	
EECF (1)			18.41	20.23	61.36	
EECF (2)		7.41	17.68	50.9	24.01	
EECF (3)		16.48	18.24	21.82	43.45	
CTRL1	64.03	19.005	16.96			
CTRL2		18.83	19.85	18.75	25.62	16.94
CTRL3			6.6	6.88	86.52	

Fig. No. 91. Peso fresco expresado en % para los diferentes estadios embrionarios F 90 (globular-corazón), F 70 (torpedo joven), F 30 (cotiledonar), para las cosechas de ES de los tratamientos de filtración (EECF) y autoclave (EECA), a los 28 (1), 35 (2) y 42 (3) días de cultivo

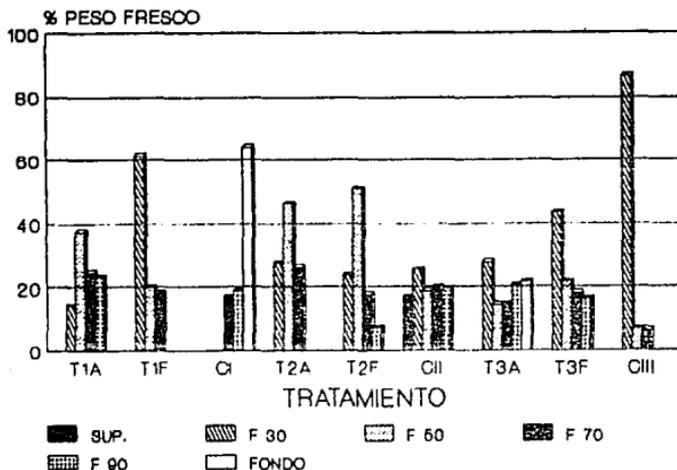


Fig. No. 92. Peso fresco expresado en % para los diferentes estadios embrionarios F 90 (globular-corazón), F 70 (torpedo joven), F 30 (cotiledonar), y la fracción de fondo, para las cosechas de ES de los tratamientos de filtración (TF) y autoclave (TA) de los extractos de embriones sexuales inmaduros, a los 28 (1), 35 (2) y 42 (3) días de cultivo

En tanto que a los 35 días, se observa la presencia de embriones somáticos en todos los estadios de desarrollo y casi en la misma proporción; finalmente a los 42 días, encontramos una gran proporción de embriones somáticos en estadio cotiledonar que indica el final del cultivo.

Por otro lado, en los lotes experimentales correspondientes a los tratamientos de autoclave y filtración, observamos que durante todo el desarrollo presentaron gran similitud en los estadios embrionarios presentes y también en las proporciones de cada uno de éstos, se observa también que en general, la heterogeneidad aumenta y las proporciones de cada estadio de desarrollo disminuyen, ya que el peso total del cultivo se divide cada vez entre más estadios de desarrollo diferentes.

#### V.7.3.6 CONTENIDO DE PROTEINAS

Los resultados de la cuantificación de las proteínas en los extractos de embriones somáticos correspondientes a las fracciones de albúminas y globulinas, después de cultivar éstos del día 21 al día 28, se muestran en la Fig. No. 93.

En los resultados de este ensayo, se observa un incremento importante en los niveles de albúminas del tratamiento por filtración con respecto a los lotes control, para las cosechas a los 28 y 42 días de cultivo (10.5 vs 4.3 mg de proteínas/g de tejido y 26.9 vs 7.5 mg de proteínas/g de tejido, respectivamente). Para la cosecha a los 35 días, los niveles de albúminas no mostraron un incremento apreciable en el contenido de proteínas de las diferentes fracciones embrionarias con respecto al control (12.49 vs 16.32 mg de proteínas/g de tejido).

Para el tratamiento por autoclave, se observa que también en las cosechas de 28 y 42 días (Figs. No. 94 y 95), las diferencias en los niveles de albúminas alcanzados por los lotes experimentales fueron mayores con respecto al control ( 20.15 vs 4.3 mg de proteínas/g de tejido y 30.5 vs. 7.5 mg de proteínas/g de tejido, respectivamente), que en la cosecha a los 35 días (16.022 vs. 19.45 mg de proteínas/g de tejido).

Cabe señalar que la presencia de estas proteínas en los diferentes estadios de desarrollo no ocurre de manera regular en el tratamiento de filtración como en el control y en el tratamiento de autoclave, esto es, con niveles bajos de albúminas en los estadios de desarrollo iniciales (corazón y globular), que incrementan en los estadios de desarrollo intermedio (torpedo) y disminuyen nuevamente en los estadios avanzados (cotiledonar). En el tratamiento de filtración, se observa que los niveles de albúminas aumentan a medida que el

estadio de desarrollo es más avanzado: en este tratamiento, el incremento de las albúminas es acompañado por un decremento en el contenido de globulinas.

En las figuras referidas se observa que el contenido de proteínas está relacionado con los estadios de desarrollo embrionario ya que al parecer los estadios más avanzados (fracciones de torpedo y cotiledonar), presentan mayores niveles de albúminas. En la cosecha a los 28 días para el tratamiento de EEC esterilizado por autoclave (Fig. No. 93), se observa que las concentraciones de albúminas no corresponden con algún incremento similar en los niveles de globulinas; en donde las concentraciones presentes son bajas y muy similares en todos los estadios de desarrollo (de 2.193 a 2.976 mg de proteína/g de tejido). Así en este tratamiento no hay un incremento notable de los niveles de globulinas, a este tiempo y los lotes experimentales se ven superados por los lotes control.

Como ya se mencionó para las cosechas a los 35 y 42 días (Fig. No. 94 y 95), es evidente que se alcanzan mayores niveles de albúminas con los dos tratamientos de EEC que con el lote control, en las siguientes gráficas se observa que el tratamiento con autoclave presenta un mayor contenido de albúminas y que a diferencia del control, los estadios de desarrollo más avanzados se observan los niveles más bajos de albúminas.

En estas dos cosechas el incremento de albúminas, si se ve acompañado por un incremento progresivo y muy importante de los niveles de globulinas (desde 1.8 hasta 10.7 mg de proteína/g de tejido). Así, las globulinas en éstos tratamientos, se presentan ahora en mayor cantidad que en el control y distribuidas más diferencialmente de acuerdo a los estadios embrionarios correspondientes. En el tratamiento de autoclave se observa que los estadios de desarrollo intermedio y avanzado contienen niveles máximos de globulinas (6.4 y 10.7 mg de proteínas/g de tejido) y los estadios de desarrollo tempranos, niveles mínimos (4.04 mg de proteínas/g de tejido).

En el caso del tratamiento de filtración, se observa que a medida que el desarrollo embrionario avanza, el contenido de globulinas en los ES disminuye, sin embargo, al igual que en el tratamiento de autoclave se obtuvo un mayor contenido de proteínas que en el lote control (8.5 vs. 4.7 mg de proteína/g de tejido), en los estadios de desarrollo más avanzados, lo cual es muy interesante ya que es muy favorable contar con éstos niveles al final del desarrollo embrionario in vitro.

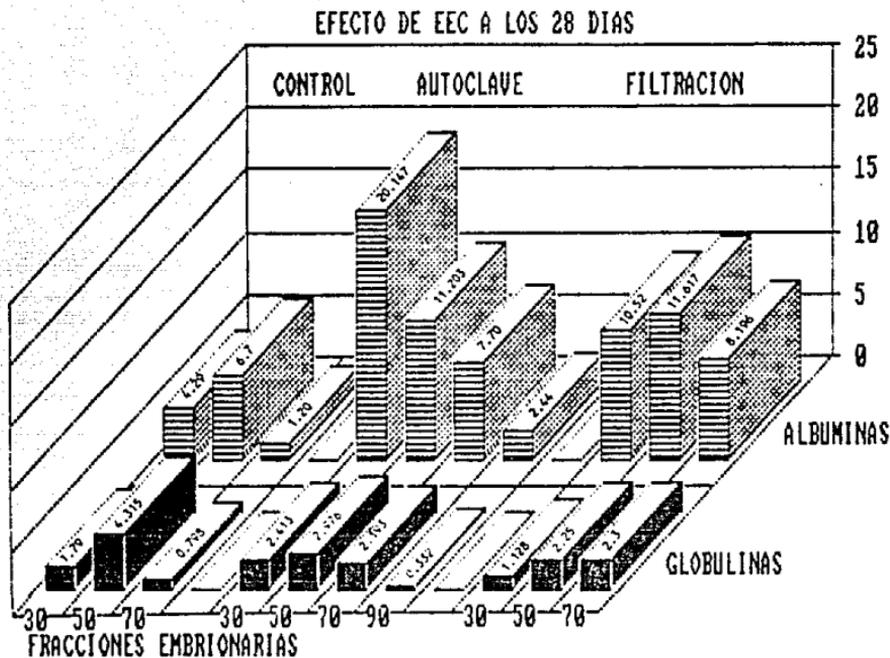


FIG. No. 93. Comparación de los niveles de albúminas y globulinas en mg. de proteína/g. de tejido fresco, obtenidos en fracciones de diferente densidad (30, 50, 70 y 90 % p/v de sacarosa), de ES cultivados en medio de desarrollo suplementado con extracto de embriones sexuales inmaduros (EEC) de 15 días p. a. esterilizado por filtración y autoclave a una concentración de 2 g/l del día de cultivo 21 al 28 (4a. semana de cultivo).

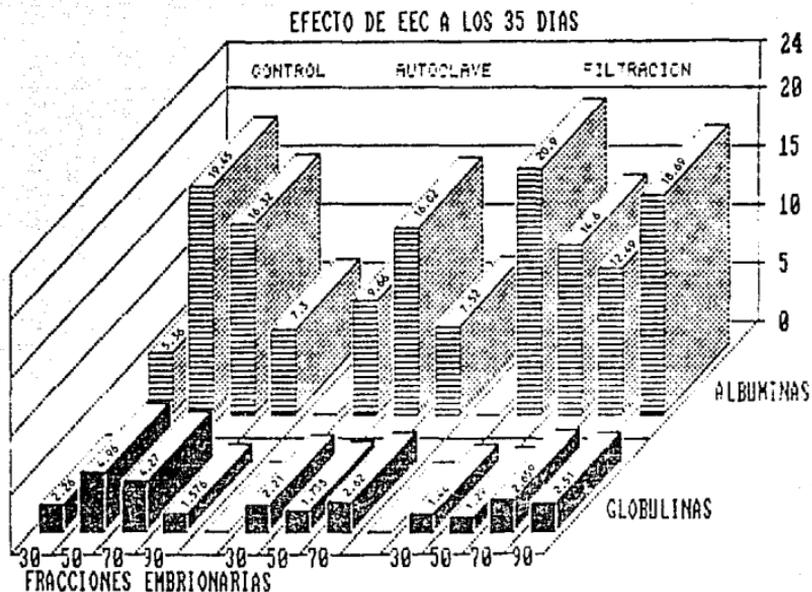


FIG. No. 94. Comparación de los niveles de albúminas y globulinas en mg. de proteína/g. de tejido fresco, obtenidos en fracciones de diferente densidad (30, 50, 70 y 90 % p/v de sacarosa), de ES cultivados en medio de desarrollo suplementado con extracto de embriones sexuales inmaduros (EEC) a 2 g/l de 15 días p.a. (durante la 4a. semana de cultivo) y de 30 días p.a. (durante la 5a. semana de cultivo), esterilizado por filtración y autoclave.

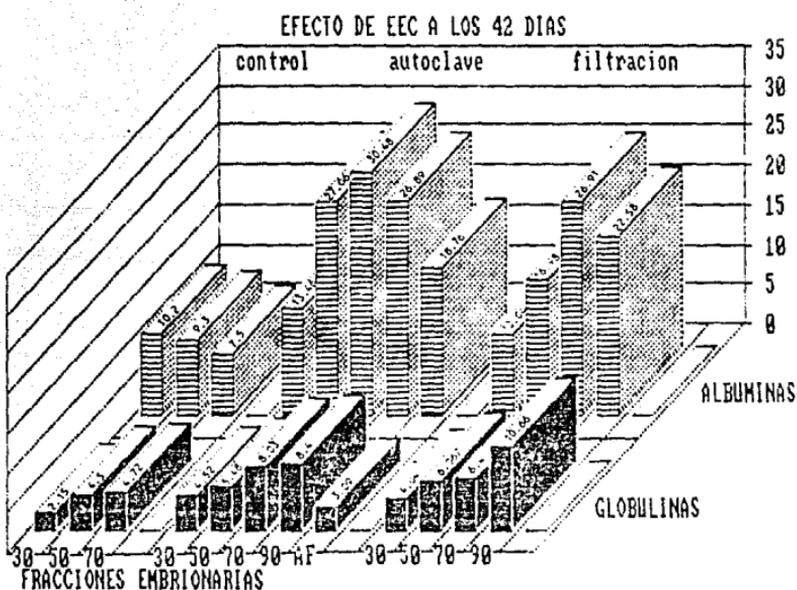


FIG. No. 95. Comparación de los niveles de albúminas y globulinas en mg. de proteína/g. de tejido fresco, obtenidos en fracciones de diferente densidad (30, 50, 70 y 90 % p/v de sacarosa), de ES cultivados en medio de desarrollo suplementado con extracto de embriones sexuales inmaduros (EEC) a 2 g/l de 15 días p.a. (durante la 4a. semana de cultivo), de 30 días p.a. (durante la 5a. semana de cultivo) y de 45 días p.a. (durante la 6a. semana de cultivo), esterilizado por filtración y autoclave.

### V.7.3.7. RELACION ALBUMINAS/GLOBULINAS

La proporción entre los contenidos de albúminas y globulinas fue evaluada para cada una de las fracciones embrionarias de las cosechas de ES cultivados en medio de desarrollo suplementado con EEC a una concentración de 2 g/l para las cosechas a los 28, 35 y 42 días de cultivo, así como en sus respectivos lotes control.

Este parámetro es una estimación de la importancia relativa de los niveles de globulinas en mg de proteína/g de tejido con respecto a los niveles de albúminas.

Los resultados de éste parámetro se muestran a en las figuras 96 y 97. En éstas figuras, se observa que la relación albúminas/globulinas, alcanzada por lotes de tratamientos con EEC fueron muy altos al inicio del desarrollo embrionario (cosecha de 28 días), siendo de 17.85 para el tratamiento de autoclave y de 4.36 para el tratamiento de filtración en las fracciones de corazón y globular, sin embargo éstos índices que fueron mayores que los observados en el lote control (2.39), fueron disminuyendo progresivamente hacia el final del desarrollo (cosecha de 42 días), en el que finalmente se alcanzaron índices de 3.33 y 2.22 para la misma fracción embrionaria, éstos valores fueron similares y aún menores en este caso, que los obtenidos con el lote control correspondiente (4.74).

RELACION ALBUMINAS/GLOBULINAS  
COSECHAS DE EEC DE 28, 35 Y 42 DIAS  
AUTOCLAVE Y FILTRACION

TRATAMIENTO	F 30	F 35	F 42	F 90	FONDO
EECA	17.85	4.97	3.27		
EECF	4.36	3.9	3.74		
CONTROL 1	2.392	1.56	1.51		
EECA	6.68	12.37	2.83		
EECF	9.46	8.4	4.77		
CONTROL 2	2.374	3.92	3.82	4.63	
EECA	3.33	4.46	4.76	2.52	
EECF	2.22	3.09	3.35	2.67	6.07
CONTROL 3	4.74	2.07	1.59		

Fig. No. 96. Relación albúminas/globulinas para los estadios embrionarios de los lotes de ES cultivados en medio de desarrollo suplementado con EEC a 2 g/l, esterilizado por autoclave (EECA) y filtración (EECF) a los 28 (1), 35 (2) y 42 (3), días de cultivo.

## RELACION ALBUMINAS/GLOBULINAS

Autoclave y filtración 28, 35 y 42 d

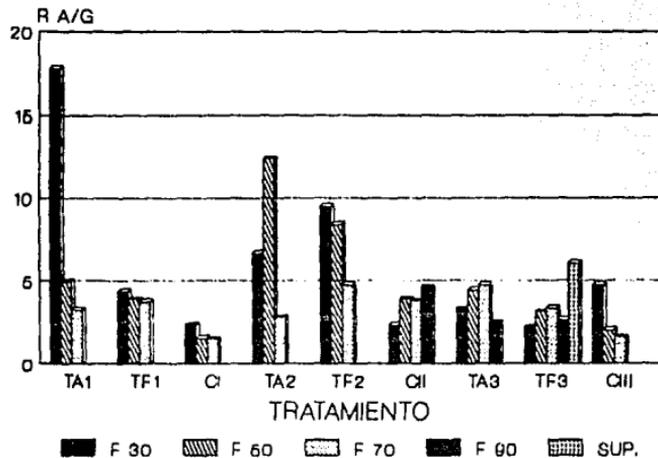


Fig. No. 97. Comparación de los niveles obtenidos en la relación albúminas/globulinas para los diferentes estadios embrionarios obtenidos al cultivar los ES en medio de desarrollo suplementado con EEC a 2 g/l esterilizado por filtración (TF) y autoclave (TA), correspondientes a los 28 (1), 35 (2) y 42 (3) días de cultivo.

De esta manera, se evidencia de manera clara que hay un cambio rápido en las actividades de síntesis de las proteínas de reserva en los embriones somáticos que involucran una primera etapa de una intensa síntesis de albúminas y posteriormente una disminución de ésta, así como un rápido incremento en la síntesis de globulinas.

Los resultados en éste parámetro fueron muy favorables ya que contar con niveles altos de proteínas de reserva hacia el final de desarrollo, es muy conveniente pues que es el momento en que los embriones somáticos han madurado, son vigorosos y cuentan con un gran contenido de material de reserva. De ésta manera éste tiempo puede ser el más adecuado para su encapsulación y preservación.

#### V.7.3.8. CARACTERIZACION DE LAS PROTEINAS DE RESERVA EN ES CULTIVADOS CON EEC.

Al igual que en los tratamientos de sorbitol y ácido ascórbico, la identificación y caracterización parcial de las proteínas de reserva extraídas de las diferentes fracciones embrionarias, fue determinada mediante el análisis de las fracciones proteicas por electroforesis en SDS-PAGE y la obtención de sus patrones polipeptídicos.

Los resultados de éstos ensayos se utilizaron para determinar el grado de similitud entre los patrones polipeptídicos obtenidos en los lotes experimentales contra las fracciones de globulinas de las diferentes fracciones embrionarias de los lotes de ES cultivados en condiciones basales y contra los que anteriormente se encontraron en las semillas.

Los resultados obtenidos se muestran en las fotografías de los geles de SDS-PAGE que se presentan en las Figs. No. 98, 99, 100, 101, 102 y 103.

En la Fig. No. 98, correspondiente al minigel de SDS-PAGE que muestra los patrones electroforéticos de las fracciones de albúminas y globulinas de los extractos de ES del tratamiento de autoclave del día de cultivo 28 al 35, se observa que los extractos de albúminas presentan algunas bandas características de las proteínas específicas de semillas de alfalfa y que en los extractos de globulinas encontramos un patrón característico de la 7 S en el estadio de desarrollo de torpedo, los principales contaminantes en la fracción de albúminas parecen corresponder (por los valores de peso molecular), a la globulina 11 S.

En el minigel de la Fig. No. 99, se muestran los patrones electroforéticos de las fracciones de albúminas y globulinas de los extractos de ES cultivados en medio de desarrollo suplementado con EEC 2 g/l esterilizado por filtración a través de membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  del día de cultivo 21 al 28.

En éste minigel, también se observa contaminación de los patrones de albúminas por polipéptidos característicos de la fracción de globulinas. Y además se observa una clara separación entre los grupos de polipéptidos más importantes (60, 50, 40 y 20 kD), sobre todo en las fracciones de globulinas. Es muy interesante que éstos patrones se observen en estadios de desarrollo terminal como es el caso de las fracciones II y I, que corresponden al estadio de torpedo maduro y cotiledonar.

En el minigel de la fig. 100 se muestran los patrones electroforéticos de las fracciones de albúminas y globulinas de los extractos de ES cultivados en medio de desarrollo suplementado con EEC 2 g/l esterilizado por autoclave del día de cultivo 28 al 35.

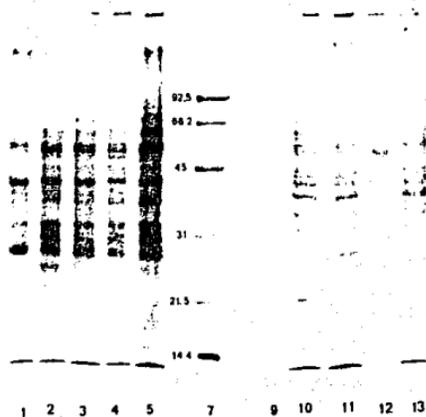
En éste minigel, se observa mucha similitud en los patrones obtenidos con las fracciones de botón, albúminas y globulinas, sin embargo, en las fracciones de globulinas, las bandas características son más importantes.

Para el caso del tratamiento de filtración del día 28 al 35 (Fig. No. 101) En éste minigel, también se observa contaminación de patrones de globulinas en albúminas. Sin embargo es importante notar que hacia el final del desarrollo se obtienen altos niveles de globulinas cuyos patrones polipeptídicos son muy claros pues presentan pocos polipéptidos de bajo peso molecular, lo que puede ser indicio de una mayor compactación o conformación de las proteínas.

En el minigel del tratamiento de autoclave del día de cultivo 35 al 42. (Fig. No. 102), se aprecia un patrón casi característico de la globulina 11 S en las fracciones de globulinas de ES, con la presencia de algunas bandas de 7 S, los patrones son limpios y son muy claros en las fracciones de los estadios de desarrollo intermedio. Las albúminas muestran gran heterogeneidad en los pesos moleculares de las bandas obtenidas y a pesar de que los niveles de estas últimas son altos, los niveles de globulinas son importantes.

En la Fig. No. 103, se observan los patrones electroforéticos de las fracciones de albúminas y globulinas del tratamiento de filtración del día de cultivo 35 al 42.

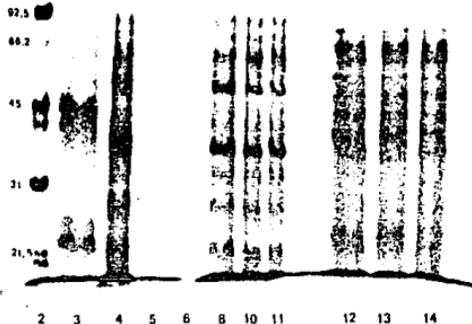
Los patrones de globulinas de éste minigel, muestran una gran cantidad de bandas características de las proteínas 7 S y 11S de las semillas de alfalfa, los patrones obtenidos son bien definidos y claros, lo que demuestra que a este tiempo de cultivo, las proteínas de reserva se encuentran bien conformadas y además en cantidades similares a las de la semilla. Es muy importante que a éste tiempo de cultivo se encuentren éstos resultados ya que de alguna manera, no se observa el mismo fenómeno de degradación o desaparición de las proteínas que se observaba en los cultivos de ES en condiciones basales.



CARRIL MUESTRA

- |    |                     |
|----|---------------------|
| 1  | Albúminas F botón   |
| 2  | Albúminas F IV      |
| 3  | Albúminas F III     |
| 4  | Albúminas F II      |
| 5  | Albúminas F I       |
| 7  | Marcadores de P. M. |
| 9  | Globulinas F botón  |
| 10 | Globulinas F IV     |
| 11 | Globulinas F III    |
| 12 | Globulinas F II     |
| 13 | Globulinas F I      |

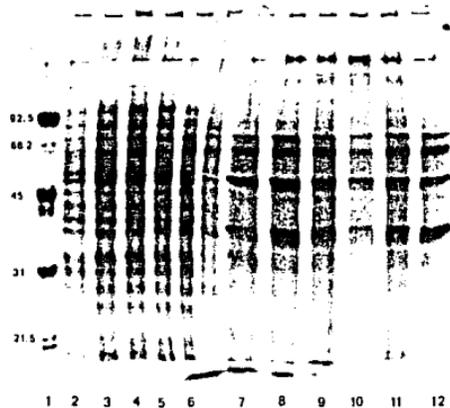
Fig. No. 98. Patrones polipeptídicos correspondientes a los extractos de albúminas y globulinas de ES cultivados en medio de desarrollo suplementado con EEC a 2 g/l esterilizado por autoclave del día de cultivo 21 al 28.



CARRIL MUESTRA

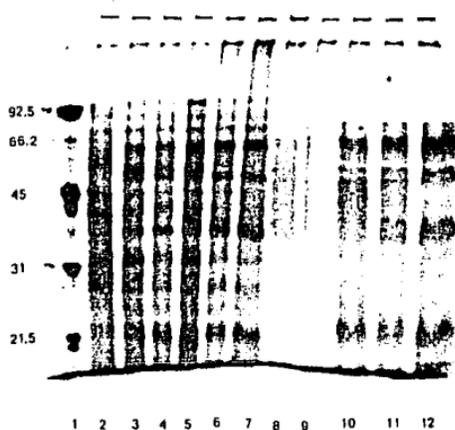
- |    |                     |
|----|---------------------|
| 2  | Marcadores de P. M. |
| 3  | Globulinas F IV     |
| 4  | Albúminas F IV      |
| 5  | Globulinas de caldo |
| 6  | Albúminas de caldo  |
| 8  | Albúminas F III     |
| 10 | Albúminas F II      |
| 11 | Albúminas F I       |
| 12 | Globulinas F III    |
| 13 | Globulinas F II     |
| 14 | Globulinas F I      |

Fig. No. 99. Patrones polipeptídicos correspondientes a los extractos de albúminas y globulinas de ES cultivados en medio de desarrollo suplementado con EEC a 2 g/l esterilizado por filtración a través de membrana de 0.22  $\mu$ m, del día de cultivo 21 al 28.



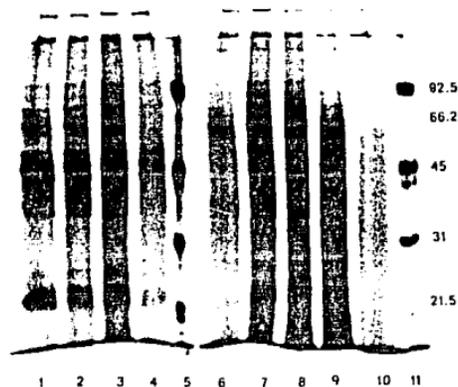
CARRIL	MUESTRA
1	Marcadores de P. M.
2	Albúminas F V
3	Albúminas F IV
4	Albúminas F III
5	Albúminas F II
6	Albúminas F I
7	Globulinas F botón
8	Globulinas F V
9	Globulinas F IV
10	Globulinas F III
11	Globulinas F II
12	Globulinas F I

Fig. No. 100. Patrones polipeptídicos correspondientes a los extractos de albúminas y globulinas de ES cultivados en medio de desarrollo suplementado con EEC a 2 g/l esterilizado por filtración del día de cultivo 28 al día 35.



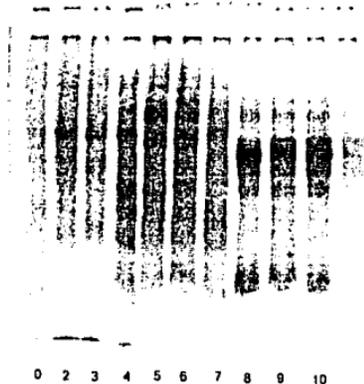
CARRIL	MUESTRA
1	Marcadores de P. M.
2	Albúminas botón F I
3	Albúminas botón F II
4	Albúminas botón F III
5	Albúminas botón F IV
6	Albúminas F I
7	Albúminas F II
8	Albúminas F III
9	Albúminas F IV
10	Globulinas F I
11	Globulinas F II
12	Globulinas F III

Fig. No. 101. Patrones polipeptídicos correspondientes a los extractos de albúminas y globulinas de ES cultivados en medio de desarrollo suplementado con EEC a 2 g/l esterilizado por autoclave del día de cultivo 28 al día 35.



CARRIL	MUESTRA
1	Globulinas F IV
2	Globulinas F III
3	Globulinas F II
4	Globulinas F I
5	Marcadores de P. M.
6	Albúminas F IV
7	Albúminas F III
8	Albúminas F II
9	Albúminas F I
10	Albúminas F 0
11	Marcadores de P. M.

Fig. No. 102. Patrones polipeptídicos correspondientes a los extractos de albúminas y globulinas de ES cultivados en medio de desarrollo suplementado con EEC a 2 g/l esterilizado por filtración del día de cultivo 35 al día 42.



CARRIL	MUESTRA
2	Albúminas F I
3	Albúminas F II
5	Albúminas F III
6	Albúminas F IV
7	Albúminas F V
8	Globulinas F I
9	Globulinas F II
10	Globulinas F III
11	Globulinas F IV
0	Globulinas F V

Fig. No. 103. Patrones polipeptídicos correspondientes a los extractos de albúminas y globulinas de ES cultivados en medio de desarrollo suplementado con EEC a 2 g/l esterilizado por autoclave del día de cultivo 35 al día 42.

### V.7.3.9. ROCKET INMUNOELECTROFESIS

El reconocimiento de las proteínas presentes en los embriones somáticos cultivados con EEC, fue completado con los ensayos mediante Rocket inmunolectroforesis, en los que se obtuvieron los resultados que se presentan en las Figs. No. 104, 105 y 106 para las fracciones de globulinas de los ES cultivados en EEC del día de cultivo 21 al 28 y del 35 al 42.

En la Fig. No. 104, correspondiente a las fracciones de globulinas de los extractos de ES cultivados del día de cultivo 21 al 28. Se observa que las fracciones embrionarias a éste tiempo no presentan niveles de proteínas de reserva 11 S y 7 S (contra las que se obtuvo el antisuero), detectables a éste tiempo.

En éstas figura, no se observa la formación de inmunoprecipitados para ninguna de las fracciones de globulinas de los lotes de tratamiento con EEC ni para los lotes control de ES, lo que sugiere que a este tiempo, aún no se completa la formación de las proteínas de reserva capaces de ser reconocidas por los anticuerpos en ninguna de las fracciones embrionarias.

En la Fig. No. 105, se muestra la placa de "Rocket" inmunolectroforesis para las fracciones de globulinas de los extractos de ES cultivados del día de cultivo 28 al 35. En ésta placa también se muestra la altura de los inmunoprecipitados obtenidos para cada muestra, así como las concentraciones estimadas de acuerdo a la altura de los inmunoprecipitados en ng de proteínas/5  $\mu$ l de muestra sin diluir.

En ésta figura, se observa que para las fracciones correspondientes a los estadios de desarrollo de torpedo joven y torpedo maduro del tratamiento de esterilización por autoclave, se obtuvieron inmunoprecipitados muy bien formados que demuestran que a éste tiempo las globulinas de los extractos de ES corresponden a las proteínas 11 S Y 7 S de las semillas ya que son específicamente reconocidas por los anticuerpos obtenidos para éstas últimas, además de que la estimación de la concentración en éstos extractos utilizando la altura de los inmunoprecipitados correspondió a 505.6 ng y 568.8 ng de proteína por cada 5  $\mu$ l de muestra de globulinas sin diluir.

Por otro lado, se observa que para el tratamiento de esterilización por filtración, también se obtuvo la formación de inmunoprecipitados para las fracciones embrionarias de cotiledonar, torpedo maduro y torpedo joven, los cuales son más pequeños que en lote de esterilización por autoclave y cuya concentración por altura corresponde a 442.4 ng, 379.2 ng y 316 ng de proteína/5  $\mu$ l de muestra sin diluir, respectivamente.

Así se observa que a éste tiempo de cultivo, los embriones somáticos cuentan ya con proteínas de reserva bien formadas e inmunológicamente identificables. Es importante señalar las concentraciones en las que éstas proteínas se presentan y que los estadios que más proteínas de reserva contienen son los de desarrollo intermedio, así como que los estadios más avanzados muestran los índices más bajos. Las diferencias entre los resultados de cada tratamiento se evidencian claramente en las placas de inmunolectroforesis obtenidas, pareciendo ser más favorable el tratamiento de autoclave.

En la Fig. No 106, correspondiente a la placa de Rocket inmunolectroforesis para las fracciones de globulinas de los extractos de ES cultivados del día de cultivo 35 al 42. En esta figura también se muestra la altura de los inmunoprecipitados obtenidos para cada muestra, así como las concentraciones estimadas de acuerdo a la altura de los inmunoprecipitados en ng de proteínas/5  $\mu$ l de muestra sin diluir.

En las figuras mencionadas se observa que los inmunoprecipitados formados por los extractos de globulinas de cada estadio de desarrollo son muy grandes y están casi en el límite de la resolución de la técnica, ya que la forma de los inmunoprecipitados no es muy clara lo que evidencia que hay un exceso de proteínas en éstos extractos. Se observa también que a medida que el desarrollo embrionario avanza, la concentración de proteína presente es mayor, alcanzado los niveles máximos en los estadios de torpedo maduro, después de éstos, cuando el desarrollo continúa hacia los estadios avanzados, la concentración de proteínas nuevamente disminuye, éste efecto es el mismo que se observaba en los extractos de ES cultivados en condiciones basales, sin embargo la diferencia con respecto a éstos es que los valores de proteínas eran casi de 0 y en los extractos con tratamiento, a pesar de la disminución de los niveles de proteínas, hay una cantidad muy importante de éstas proteínas.

Otro aspecto importante a considerar es que en ésta última cosecha se alcanzaron niveles máximos de globulinas y que al final no hay una diferencia evidente entre el tratamiento de filtración y el de autoclave, pues las concentraciones de proteínas de reserva 11 S y 7 S obtenidas, son muy similares

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

POZO	MUESTRA	ALTURA (cm)	DMC. (mg/5 ul)
1	CTRL Semilla 1250 mg	11,5	1250
2	CTRL Semilla 1250 mg	11	1250
3	CTRL Semilla 625 mg	8	625
4	1a. autoclave F I		
5	1a. autoclave F II		
6	1a. autoclave F III		
7	1a. autoclave F IV		
8	1a. filtracion F I		
9	1a. filtracion F II		
10	1a. filtracion F III		
11	CTRL ES F I		
12	CTRL ES F II		

Fig. No. 104. Placa de Rocket Immunoelectroforisis para los extractos de globulinas de los diferentes estados de desarrollo embrionario, cultivados en medio de desarrollo suplementado con EEC a 2 g/l del día de cultivo 21 al 26.

3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

POZO	MUESTRA	ALTURA (cm)	DMC. (mg/5 ul)
3	CTRL Semilla 312,5	5	312,5
4	CTRL Semilla 156 mg	4	156
5	2da. autoclave F I	8	505,6
6	2da. autoclave F II	9	569,8
7	2da. autoclave F I	-	-
8	2da. filtracion F I	-	-
9	2da. filtracion F I	5	316
10	2da. filtracion F I	6	312,5
11	2da. filtracion F I	7	442,4
12	CTRL Semilla 1250 m	barrido	

Fig. No. 105. Placa de Rocket Immunoelectroforisis para los extractos de globulinas de los diferentes estados de desarrollo embrionario, cultivados en medio de desarrollo suplementado con EEC a 2 g/l del día de cultivo 28 al 35.



## VI. CONCLUSIONES

Dado que en el presente trabajo, se evaluó un gran número de parámetros en los embriones somáticos (ES) de alfalfa (Medicago sativa L. var. Reagenlander L. A7034), obtenidos in vitro, así como algunas características de los materiales de reserva que éstos contienen, a continuación se integran los resultados y análisis de todas éstas variables lo que nos permite evaluar la importancia de los resultados obtenidos en ésta investigación acerca de como ocurre en ésta especie el proceso de embriogénesis somática y la expresión y acumulación de las proteínas de reserva durante el desarrollo embrionario in vitro, tanto en condiciones de cultivo basales como en medios de desarrollo suplementados con diversos agentes que de alguna manera inhiben la germinación precoz y que favorecen la acumulación de éstos materiales de reserva.

En el presente estudio, donde el objetivo principal fue determinar la expresión y acumulación de algunos de los materiales de reserva específicos de las semillas de alfalfa (proteínas y carbohidratos), en los embriones obtenidos en el sistema de embriogénesis somática de la alfalfa A7034, se llegó a las siguientes conclusiones:

Se logró realizar la extracción, cuantificación y caracterización parcial de las albúminas y globulinas de los embriones sexuales maduros (semillas) y de los ES. Los protocolos utilizados para cada ensayo demostraron ser prácticos, sensibles, confiables y reproducibles. Mediante éstos métodos se logró establecer la identidad de las proteínas de reserva (globulinas), presentes en los ES y sexuales, evidenciando claramente que se trata de las mismas proteínas en ambos casos y que los ES cuentan realmente con todo lo necesario para la síntesis de éstas, aún cuando la acumulación en los ES no ocurre como en la semilla, lo cual puede ser debido más bien a las características morfológicas de los ES y no a su maquinaria biosintética.

Mediante la cinética de desarrollo que fue realizada para analizar la morfología, desarrollo, crecimiento, respuesta, rendimiento, germinación y niveles de proteínas de reserva específicas de los ES cultivados en condiciones basales en fotoperíodo y oscuridad, se logró ubicar puntualmente los momentos más importantes de síntesis, acumulación y pérdida de las proteínas de reserva de los ES, así como la calidad del cultivo durante todo el desarrollo de los embriones in vitro.

Los ES cultivados en un medio de desarrollo basal y en condiciones de fotoperíodo, demostraron contener más proteínas de reserva específicas de las semillas de alfalfa, que sus similares obtenidos en condiciones de oscuridad. En

los cultivos en fotoperiodo también se obtuvo una mejor calidad del cultivo, esto es, índices de respuesta, rendimiento, crecimiento y germinación mayores que en el cultivo en oscuridad.

Para el análisis detallado del contenido de proteínas de reserva presentes en cada uno de los estadios embrionarios obtenidos, se logró establecer un método confiable para la separación de éstos, mediante la utilización de gradientes de densidad discontinua de sacarosa. Con los resultados de éste experimento, se pudieron establecer los cambios en los niveles de las proteínas de reserva durante el cultivo in vitro encontrándose que en fotoperiodo el contenido máximo de éstas proteínas ocurre entre los 33 y 36 días de cultivo y que hacia el final del desarrollo embrionario, éstas disminuyen su concentración en mg de proteína/g de tejido hasta casi desaparecer. Por otro lado, en el cultivo en oscuridad los máximos se alcanzan, entre los 36 y 39 días de cultivo y si bien, la acumulación de proteínas ocurre después que en fotoperiodo, también se observa una pérdida de éstas al final del cultivo. Esta última característica delo cultivo en oscuridad, sumada a los niveles de respuesta, rendimiento, crecimiento y germinación, demuestran que el desarrollo embrionario en oscuridad ocurre más lentamente que en fotoperiodo, lo que si bien puede considerarse como una mejor emulación del desarrollo in vitro, es desfavorable porque presenta menor contenido de globulinas y menores índices de germinación que el caso de fotoperiodo.

Estos resultados aunados con las características de calidad del cultivo en condiciones basales, permitieron determinar que efectivamente, los ES no acumulan materiales de reserva y germinan precozmente, al mismo tiempo que se ubicaron los momentos más probables de alteración de la expresión de las globulinas en éstos embriones para obtener resultados satisfactorios en los niveles de expresión y acumulación de éstos materiales de reserva.

Se definió que a partir del día de cultivo 28, podrían ser aplicados exógenamente al cultivo, los diferentes agentes de manipulaciones de medio con el fin de permitir la integración y acumulación de los mismos en los callos y ES.

En cuanto al objetivo de regular hasta cierto punto la expresión genética de los ES, podemos decir que si bien no se obtuvieron niveles de proteínas de reserva mucho mayores que en la semilla, si hubo un efecto muy marcado con cada manipulación de de medio probada, siendo la mejor la de extracto de embriones sexuales inmaduros (EEC) de alfalfa de 15, 30 y 45 días post-antesis aplicado al medio de cultivo en una concentración de 2 g/l y cronológicamente de una manera casi paralela entre el desarrollo embrionario in vivo e in vitro, con ésta manipulación de medio no se provocó un efecto negativo en el cultivo obteniéndose muy buenos resultados en

los parámetros de calidad del cultivo y en los niveles de las proteínas de reserva, en relación con los controles en condiciones basales y con las otras manipulaciones de medio probadas.

Este extracto probado después de su esterilización por autoclave y filtración dio resultados similares, observándose pequeñas diferencias entre estos dos tratamientos, lo cual demuestra que el factor responsable del efecto positivo en el cultivo in vitro, está presente en ambos, por lo que no es termolábil. Un aspecto muy importante de considerar con este tratamiento es que los índices de germinación son muy buenos y que al experimentar con este agente podemos tener confianza en la regeneración de plántulas sanas.

De acuerdo con los resultados obtenidos con este tratamiento, podemos decir que el cultivo pudo verse favorecido por la presencia en este extracto de algún o algunos agentes moduladores del desarrollo embrionario que tienen un efecto inhibitorio sobre la germinación precoz y permiten la acumulación de las proteínas de reserva. Así, nosotros consideramos que dado que se trata de un extracto de embriones cigóticos, este pudo aportar factores que en el cultivo in vitro basal no existen, por lo que permitió emular eficazmente el desarrollo embrionario in vitro con el desarrollo in vivo.

Estos resultados son atribuidos a este agente de una manera un tanto imprecisa pues no se tiene ubicado bioquímicamente el factor que pudiera determinar este efecto, sin embargo, estos resultados establecen una pauta que puede seguirse en investigaciones posteriores en las cuales se intente aislar, identificar y caracterizar los principales moduladores bioquímicos de la expresión genética de las proteínas de reserva en estos ES a partir del extracto de embriones sexuales inmaduros.

Así, se deja planteada como una buena alternativa el utilizar el extracto de semillas de alfalfa de 15, 30 y 45 días post-antesis a diferentes concentraciones y recomendando la utilizada en este trabajo, que fue de 2 g/l con un protocolo de cultivo bajo condiciones de fotoperíodo, sin embargo también sería interesante probar este extracto en condiciones de oscuridad de acuerdo a los resultados obtenidos en los cultivos basales en oscuridad. Los tiempos de exposición de los ES a este agente durante tiempos de cultivo de una semana o más, son favorables. Se propone también el cultivo continuo o por pulsos desde 21 hasta 42 días con medio de desarrollo suplementado con EEC de 15, 30 y 45 días post-antesis.

En relación a las otras manipulaciones de medio probadas, podemos decir que el medio de desarrollo suplementado con ABA a una concentración de  $10^{-5}$  M, no

favoreció la calidad del cultivo (respuesta, rendimiento, crecimiento y germinación), no obstante, los resultados en los niveles de germinación de los ES fueron interesantes, ya que si bien se abatió casi totalmente la germinación de los ES, esto también es una evidencia de que se inhibió en gran medida la germinación precoz de los ES, retrasando la germinación de éstos durante semanas. También se observó que los niveles de proteína no se incrementaron apreciablemente y que éstas no correspondieron a las proteínas de reserva maduras específicas de las semillas de alfalfa ya que en el Rocket inmunoelectroforesis, se logró identificar sólo una porción de éstas proteínas que parece corresponder a una de las subunidades ( $\beta$ ) de la globulina 7 S de la alfalfa, las demás proteínas presentes en los extractos de éste tratamiento no fueron reconocidas por el anticuerpo como proteínas de reserva. Cabe señalar que el tratamiento puede resultar parcialmente satisfactorio, pues se logró incrementar la concentración de ésta subunidad.

Estos resultados permiten determinar que éste agente puede ser probado a menores concentraciones o con tiempos de exposición menores a 3 días, pudiendo aplicar las concentraciones mínimas de manera continua durante el cultivo y las máximas por pulsos, de tal manera que no se someta al tejido a un suministro drástico de ABA, que impida el desarrollo normal de los embriones y que al mismo tiempo tenga un efecto inhibitorio de la germinación, suficiente para provocar algún tipo de latencia en los ES.

Así, el ABA para éste trabajo se consideró como un agente con efectos desfavorables para el cultivo in vitro y no recomendable para lograr los objetivos planteados a la concentración y tiempos de exposición probados.

El sorbitol probado a las concentraciones de 2, 8 y 12 ‰ p/v en éstos experimentos, demostró tener un efecto más favorable que el ABA, ya que se obtuvieron mejores índices de calidad del cultivo y altos niveles de proteínas de reserva que en éste último. Las proteínas obtenidas con éste agente fueron reconocidas por los anticuerpos vs. las proteínas de reserva específicas de los embriones sexuales de alfalfa, lo que significa que en la presencia de sorbitol éstas proteínas pueden sintetizarse y acumularse hasta cierto nivel, sobre todo en las concentraciones de 2 y 12 ‰, ya que al parecer a la concentración de 8 ‰, hubo alguna alteración en el cultivo y en los niveles de las proteínas de reserva que impidió evaluar adecuadamente el efecto de ésta concentración en la calidad del cultivo y en los niveles de proteínas de reserva obtenidos.

De manera similar que el ABA, éste agente puede ser de utilidad al ser probado a diferentes concentraciones y durante tiempos de exposición más cortos para evitar un fuerte estrés hídrico en los embriones cultivados in vitro.

Así, podemos decir que en el presente trabajo se lograron determinar de manera satisfactoria, las principales características de la embriogénesis somática de la alfalfa y el comportamiento de los niveles de proteínas de reserva en los ES cultivados en condiciones basales, así como el efecto de los diversos agentes probados en los mismos.

Así, la idea de hacer un primer acercamiento a la regulación epigenética de la expresión en los ES, tuvo resultados satisfactorios que dejan sugeridos diseños experimentales interesantes a probar con miras a mejorar los resultados del presente trabajo.

Se deja planteada entonces, la alternativa de emplear diversos protocolos de cultivo con los agentes de manipulaciones de medio aquí probados, así como el uso de algunos otros, como inhibidores de proteasas o retardantes de crecimiento tales como CCC o AMO-1618, los cuales al parecer pueden inhibir eficazmente la germinación precoz o detener el cultivo temporalmente en una fase indicada. Los posibles diseños experimentales pueden los tiempos de cultivo que se consideren más convenientes de acuerdo a la cinética de desarrollo.

Estas alternativas se refieren básicamente al alargamiento o congelamiento del estado embrionario, ya que esto facilitaría la acumulación de las proteínas de reserva, dado que los ES cuentan con la maquinaria bioquímica para sintetizarlas, sin embargo, no hay que olvidar que a nivel estructural pueden requerirse elementos que de no encontrarse en los ES o de no estar organizados de la manera adecuada, no permitan la acumulación.

Es necesario señalar que el análisis de los carbohidratos en las diferentes fracciones embrionarias fue incompleto, pues no se caracterizaron los diferentes carbohidratos presentes en éstos embriones, ni el cambio en sus niveles o concentraciones durante el desarrollo embrionario in vitro, sino únicamente se detectó la actividad hidrolítica de la alfa-amilasa, como un marcador indirecto de la presencia de almidón. Cabe señalar que es necesario profundizar en el estudio de éstos materiales de reserva y su análisis durante el desarrollo embrionario, para lo cual se requiere del empleo de numerosas técnicas analíticas y tiempo, por lo que en el presente estudio no fue posible continuar con el análisis mencionado.

De esta manera, es evidente que se requiere de más estudios que permitan conocer más de la expresión y regulación de los materiales de reserva (sobre todo carbohidratos), en éstos sistemas, los cuales pueden ser muy útiles para el entendimiento de éstos procesos en la alfalfa y en otras especies de la familia Leguminosae.

## VII. BIBLIOGRAFIA CITADA

- Adams, C. A. and R. W. Rinne. 1980. Moisture content as a controlling factor in seed development and germination. *Int. Rev. Cytol.* 68: 1-8.
- Ammirato, P. V. 1987. Organizational events during somatic embryogenesis. In: *Plant tissue and cell culture*. V. 3., C. E. Green, D. A. Somers, W. P. Hackett, and D. D. Biesboer. (Eds.). Alan R. Liss Inc. New York. p. 57-81.
- Ashton, F. M. 1976. Mobilization of storage proteins of seeds. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 27:95-117.
- Atanassov, A. and D. C. W. Brown. 1984. Plant regeneration from suspension culture and mesophyll protoplasts of Medicago sativa L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 3: 149-162.
- 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.
- Blair, Brengle., S. R. Wassall and W. Stillwell. 1988. Abscisic acid enhancement of lipid vesicle aggregation. *Plant Science*, 54: 245-249.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bray, E. A. and R. N. Beachy. 1985. Regulation by ABA of Beta-Conglycinin expression in cultured developing soybean cotyledons. *Plant Physiol.* 79: 746-750.
- Brengle, B., S. R. Wassall., W. Stilwell. 1988. Abscisic acid enhancement of lipid vesicle aggregation. *Plant Science* 54: 245-249.
- Brown, D.C.W. and A. Atanassov. 1985. Role of genetic background in somatic embryogenesis in Medicago. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 4: 111-122.
- Brown, C. S. and S. C. Huber. 1988. Reserve mobilization and starch formation in soybean (Glycine max) cotyledons in relation to seedling growth. *Physiologia Plantarum* Copenhagen. 72: 518-524.
- 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.

- Chen, L. S. and D. S. Luthe. 1987. Analysis of proteins from embryogenic and non-embryogenic rice (*Oryza sativa* L.) calli. *Plant Science*. 489: 181-188.
- Chrispeels, Marten J. 1981. The role of the endoplasmic reticulum in the mobilization of reserve macromolecules during seedling growth. Review. *Israel Journal of Botany*. Vol. 29. 225-245.
- Christianson, M.L. and D. A. Warnick. 1983. Competence and determination in the process of in vitro shoot organogenesis. *Developmental Biology* 95, 288-293.
- Christianson, M. L. 1987. Causal events in morphogenesis. In: *Plant tissue and cell culture*. V. J. C. E. Green., D. A. Somers., W. P. Hackett and D. D. Biesboer. (Eds.). Alan R. Liss Inc. New York p. 45-55.
- Cowan, I. R., Raven, J. A., Hartung, W., Farquhar, G. D. 1982. A possible role for abscisic acid in coupling stomatal conductance and photosynthetic carbon metabolism in leaves. *Aust. J. Plant Physiol.* 9:489-498.
- Crouch, M. L., 1982. Non-zygotic embryos of *Brassica napus* L. contain embryo-specific storage proteins. *Planta* 156: 520-524.
- Crouch, M. L., Sussex, I. M. (1981). Development and storage proteins synthesis in *Brassica napus* L. embryos *in vivo* e *in vitro*. *Planta* 153: 64-74.
- Croughan, T. P., S. J. Stavarek and D. W. Rains. 1978. *Crop Sci.*, 15:719
- Del Pozo Ibañez, M. 1977. La alfalfa su cultivo y aprovechamiento. Ed. Mundi Prensa. Madrid, España.
- DeLisle, A.J. and M. L. Crouch. 1989. Seed storage protein transcription and mRNA levels in *Brassica napus* during development and in response to exogenous abscisic acid. *Plant Physiol.* 91: 617-623.
- Derbyshire, E. and D. Boulter. 1976. Isolation of legumin-like protein from *Phaseolus aureus* and *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry* 15: 411-414.
- Derbyshire, E., D. J. Wright., D. Boulter. 1976. Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *Phytochemistry* 15: 3-24.
- Dijak, M. and D. H. Simmonds. 1988. Microtubule organization during early direct embryogenesis from mesophyll protoplasts of *Medicago sativa* L. *Plant Science*, 58: 183-191.

- Dos Santos, A. V. P., D. E. Outka., E. C. Cocking., M. R. Davey. 1980. Organogenesis and somatic embryogenesis in tissues derived from leaf protoplast and leaf explants of Medicago sativa. Z. Pflanzenphysiol. Bd. 99: 261-270.
- Dos Santos, A. V. P., E. G. Cutter., and M. R. Davey. 1983. Origin and development of somatic embryos in Medicago sativa L. (Alfalfa). Planta 117. 107-115.
- Dure, L. S. 1975. Seed formation. Ann. Rev. Plant Physiol. 26: 259-278.
- Eisenberg, A. J. and J. P. Mascarenhas. 1985. Absciscic acid and the regulation of synthesis of specific seed proteins and their messenger RNAs during culture of soybean embryos. Planta 166: 505-514.
- Finkelstein, R. R. and M. Crouch. 1986. Rapeseed embryo development in culture on high osmoticum is similar to that in seeds. Plant Physiol. 81: 907-912.
- Gamborg, O., R. Miller and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures and soybean root cells. Exp. Cell Res, 50: 151-158.
- Hahne, G., J. E. Mayer., H. Lörz. 1988. Embryogenic and callus-specific proteins in somatic embryogenesis of the grass, Dactylis glomerata L. Plant Science 55: 267-279.
- Hamilton, M. J. and J. Vanderstoep. 1979. Germination and nutrient composition of alfalfa seeds. Journal of Food Science. Vol. 44. No. 2, 443-445.
- Hanson, C. H. 1972. Ciencia y tecnologia de la alfalfa. Ed. Hemisferio Sur. Montevideo, Uruguay.
- Higgins, T. J. V. 1984. Synthesis and regulation of major proteins in seeds. Ann. Rev. Plant Physiol. 35: 191-221.
- Ilan, I. and S. Gepstein. 1981. Hormonal regulation of food reserve breakdown in germinating dicotyledonous seeds. Review. Israel Journal of Botany. Vol. 29. 193-206.
- Kao, K.N. and M. R. Michayluk. 1980. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of Alfalfa. Z. Pflanzenphysiol Bd. 96: 135-141.
- King, P.J. 1984. Oxfords Survey of Plant Molecular & Cell Biology 1: 7-32.
- Kohlenbach, H. W. 1978. Comparative somatic embryogenesis. In: Thorpe, T. A. (ed.), Frontiers of Plant Tissue Culture I.A.P.T.C. University of Calgary Press. 59-66

- Komamine, A., K. Nomura., V. Raghavan. 1984. Molecular mechanisms of somatic embryogenesis. Int. Natl. Sympos on Genet Manipulation in crops (October 22-26): 76
- Koshiyama, I. and D. Fukushima. 1976. Identification of the 7S globulin with B-conglycinin in soybean seeds. Phytochemistry. 15: 157-159.
- Kuhlemeier, Green & Chua. 1987. Plant gene regulation. Ann. Rev. Plant Physiol. 234-239.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.
- Larkins, P.J. and Scowcroft, W.R. 1981. Theor. Appl. Genet. 60: 197-214.
- Laurell, C. B. 1972. Electroimmuno assay. Scand. J. clin. Lab. Invest. 29 Suppl. 124: 21-37.
- Lesins, K. y C. B. Gillies. 1972. Taxonomy and cytogenetics of Medicago. In: Alfalfa science and technology. Hanson, H. C. (Ed.). American Society of Agronomy Inc. pags. 53-83.
- McClearly, B. V. and N. K. Matheson. 1976. Galactomannan utilization in germinating legume seeds. Phytochemistry. Vol. 15. 43-47.
- McCoy, T. J. and K. Walker, 1984. Alfalfa. In: Handbook of plant cell tissue culture. V. 2. McMillan Publishing Co. New York. p. 171-192.
- Meijer, E. G. M. and D. C. W. Brown. 1987. Role of exogenous reduced nitrogen and sucrose in rapid high frequency somatic embryogenesis in Medicago sativa. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 10: 11-19.
- Meredith, C.P. 1984. In: Gene Manipulation in Plant Improvement, Gustafson, J. P.(ed.), Plenum Press. New York. 503-528.
- Michler, C.H. and R D. Lineberger. 1987. Effects of lighth on somatic embryo development and abscisic levels in carrot suspension cultures. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 11: 189-207.
- Millerd, A. 1975. Biochemistry of legume seed proteins. Ann. Rev. Plant Physiol. 26: 53-72.
- Morris, P. C., E. W. Weiler., S.E. Maddock., M.G.K. Jones., L. and D. J. Bowles. 1988. Determination of endogenous abscisic acid levels in immature cereal embryos during in vitro culture. Planta 173: 110-116.

- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Murashige, T. 1978. The impact of plant tissue culture on agriculture. In: *Frontiers of plant tissue culture*. T. A. Thorpe (Ed.). The International Association for plant tissue culture. p. 22.
- Murashige, T. 1979. Plant Tissue Culture and its importance to agriculture. In: Chapter 3. *Practical Tissue Culture Applications*. Ed. Academic Press. pages. 27-43.
- Nagarajan, J.S. McKenzie, and P. D. Walton. 1986. Embryogenesis and plant regeneration of *Medicago* spp in tissue culture. *Plant Cell Reports*. 5: 77-80.
- Negrutiu, I., Jacobs, M. and Cobache, M. 1984. *Theor. Appl. Genet.* 67, 289-304.
- Nomura, K. and A. Komamine. 1986. Polarized DNA synthesis and cell division in cell clusters during somatic embryogenesis from single carrot cells. *New Phytol.*, 104: 25-32.
- Novak, F.J. and D. Koněcna. 1982. Somatic embryogenesis in callus and cell suspension cultures of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 105 S. 279-284.
- O'Farrell, P. H. 1975. *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4021.
- Orton, T. J. 1983. *Theor. Appl. Genet.* 67: 17-24.
- Peña, C. J. 1988. Encapsulación de embriones somáticos obtenidos *in vitro*. Tesis profesional. UNAM Escuela de estudios profesionales "Zaragoza". México. 178 p.
- Perez-Grau, L. and R. B. Goldberg. 1989. Soybean seed protein genes are regulated spatially during embryogenesis. *The Plant Cell*. Vol. 1 1095-1109.
- Pernollet, J. C. and J. Mossé. 1983. Structure and location of legume and cereal seed storage proteins. In: *Seed proteins*. J. Daussant., J. Mossé and J. Vaughan. ed. Academic Press. London. 155-191.
- Pernollet, J. C. 1985. Biosynthesis and accumulation of storage proteins in seeds. *Physiol. Vég.* 23 (1), 45-59.
- Pierce, M., Raschke, K. 1980. Correlation between loss of turgor and accumulation of abscisic acid in detached leaves. *Planta* 148: 174-182.

- Fliego, M. V. H. 1989. Estudio sobre el desarrollo de variedades mejoradas de alfalfa con altos rendimientos y adaptabilidad. Ensayo bibliográfico. IPN Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México. 53 p.
- Quatrano, R.S., Ballo, B. L., Williamson, J.D., Hamblin, M. T., Mansfield, M. 1983. ABA controlled expression of embryo specific genes during wheat grain development. In UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. N. S. vol. 12: Plant Molecular Biology, pp. 343-353, Goldberg, R. B., ed. Allan R. Liss, New York.
- Raghavan, V. 1976. Experimental Embryogenesis in Vascular Plants. Academic Press, New York.
- Rao, R. and J. C. Pernollet. 1981. Pisum sativum seed globulins as biochemical markers for "wrinkled-smooth" seed character: comparison of genotypes through different protein extraction and electrophoretic procedures. Agronomia 10: 909-916.
- Redenbaugh, K., J. Nichol., M. E. Kessler., B. Paasch. 1984. Encapsulation of somatic embryos for artificial seed production. In vitro. 20: 256-257.
- Redenbaugh, K., P. Viss., D. Slade., J. Fujii. 1986. Scale-up: Artificial seeds. In: VI International congress of plant tissue and cell culture. D. A. Somers., B. G. Gengenbach., D. D. Biesboer., W. P. Hackett., L. E. Green. (Eds.). University of Minnesota. Minneapolis, Minnesota. U.S.A. p. 132.
- Reich, B., E. T. Bingham. 1980. The genetic control of bud formation from callus cultures of diploid alfalfa. Plant Science Letters. 20: 71-77.
- Reich, B., E. T. Bingham. 1981. Plants from ethionine-resistant alfalfa tissue cultures: variation in growth and morphological characteristics. Crop Science. 21: 783-788.
- Sharp, W. R., M. R. Sondhal., L. S. Caldas., S. B. Maraffa. 1980. The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. Hortic. Rev. 2. (77): 268-310.
- Sharp, W. R., D. A. Evans., P. V. Ammirato. 1984. Plant genetic engineering: designing crops to meet food industry specifications. Food technology. 38 (2): 112-119.
- Shoemaker, R.C., S.E. Christofferson, and D.W. Galbraith. 1987. Storage protein accumulation patterns in somatic embryos of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Plant Cell Reports 6: 12-15.
- Skokut, T. A., J. Manchester and J. Schaefer. Regeneration in Alfalfa tissue culture. Plant Physiol. 79: 579-583.

- Bondhal, M. R., W. R. Sharp. 1977. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of Coffea arabica L. Z. Pflanzenphysiol. 81: 395-408.
- Stanford, E. H., C. M. William., E. T. Bingham. 1972. Cytology and evolution of the Medicago sativa-falcata complex. In: Alfalfa Science and Technology. C. H. Hanson. (Ed.). American Society of Agronomy. U.S.A. p. 87-89.
- Stavarek, S. J., T. P. Croughan., D. W. Rains. 1980. Regeneration of plants from long-term cultures of alfalfa cells. Plant Science Letters. 19: 253-261.
- Stirn, S. and H.J. Jacobsen. 1987. Marker proteins for embryogenic differentiation patterns in pea callus. Plant Cell Reports 6: 50-54.
- Stuart, D. A., J. Nelsen., S. G. Strickland. and J. W. Nichol. 1985. Factors affecting developmental processes in alfalfa cell cultures. Tissue Culture in Forestry and Agriculture. Ed. by R. R. Henke., K.W. Huges., M.P. Constantin., and A. Hollander. Plenum Press. New York. pages. 59-73.
- Stuart, D.A., J. Nelsen. 1988. Isolation and characterization of alfalfa 7S and 11S seed storage protein. J. Plant Physiol. 132: 129-133.
- Stuart, D.A., J. Nelsen. and J. W. Nichol. 1988. Expression of 7S y 11S alfalfa seed storage proteins in somatic embryos. J. Plant Physiol. 132: 134-139.
- Sung, Z. R. 1985. Developmental biology of plant embryogenesis. Plant Genetics. 115-120. Alan R. Liss Inc.
- Bussex, I. M., Dale, R.M.K., Crouch, M. L. 1980. Developmental regulation of storage protein synthesis in seeds. In: Genome organization and expression in plants, pp. 283-289, Leaver, C.J., ed. Plenum Press, New York.
- Thompson, A. J., I. M. Evans, D. Boulter, R. R. D. Croy and J. A. Gatehouse. 1989. Transcriptional and posttranscriptional regulation of seed storage-protein gene expression in pea (Pisum sativum L.). Planta 179: 279-287.
- Tiedemann, H. 1972. Factors determining embryonic differentiation. J. Cell. Physiol. 1: 129-144.
- Tisserat, B., E. B. Esan. and T. Murashige. 1979. Hort. Rev. 1: 1-78.
- Toncelli, F., Martini, G., Giovinazzio, G. and Nuti Ronchi, V. 1985. Theor. Appl. Genet. 70, 345-348.

- Vavilov, N. I. 1951. The origin and variation, immunity and breeding of cultivated plants. Selected writings. Translated from the Russian by Chester, K. Starr. Ronald Press Company. New York, U.S.A.
- 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.
- Villegas, T. L. 1991. (Comunicación personal). Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. I. P. N. México, D. F.
- Walker, K. A., M. L. Wendel., E. G. Jaworski. 1979. Organogenesis in callus tissue of *Medicago sativa*: The temporal separation of induction processes from differentiation processes. *Plant Science Letters*. 16: 23-30.
- Zeevaart, J. A. D., and R. A. Creelman. 1988. Metabolism and physiology of abscisic acid. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 439-473.