



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"ZARAGOZA"
Carrera de Biología

CAMBIOS EN EL CONTENIDO DE PROTEINAS DE
RESERVA EN EMBRIONES SOMATICOS DE ALFALFA
(Medicago sativa L.) POR VARIACIONES EN EL MEDIO
DE CULTIVO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A:
ELOY GARCIA PACHECO



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

1993



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.

R E S U M E N.

En la actualidad el cultivo de tejidos vegetales está siendo empleado en una gran diversidad de estudios y no solamente para la propagación masiva de plantas. Uno de los campos en donde el cultivo de tejidos vegetales puede aportar un gran caudal de conocimientos es en el de los estudios bioquímicos. En el presente trabajo se realizaron estudios bioquímicos relacionados con la cantidad de proteínas de reserva en embriones somáticos de alfalfa. Se procedió a suplementar el medio de cultivo empleado para la embriogénesis somática de alfalfa con extractos de semillas de alfalfa con diferentes grados de madurez. Se evaluó el efecto de los extractos empleados sobre la respuesta, el rendimiento, la eficiencia, el peso del callo y la conversión de los embriones somáticos obtenidos en cada tratamiento. También se analizó, mediante geles de poliacrilamida-SDS, la cantidad de proteínas de reserva presentes en los diferentes estadios embrionarios obtenidos de cada tratamiento.

La adición de extractos al medio de cultivo no tuvo un efecto uniforme sobre los diferentes parámetros evaluados. El efecto de cada uno de los extractos dependió del momento de su aplicación así como de la duración del cultivo en cada medio. Además, la conversión a plántula no mostró relación alguna con la cantidad de proteínas de reserva presentes en los embriones somáticos. También se encontró que la síntesis de las proteínas de reserva en el embrión somático muestra un orden inverso con respecto al orden encontrado en la semilla. Por último, se encontró que los parámetros evaluados poseen mecanismos de regulación totalmente independientes uno del otro.

Es posible que para favorecer la acumulación de proteínas de reserva sea necesario alterar procesos como son la división celular y al endorreduplicación del material genético ya que se ha reportado que, en semillas, estas modificaciones preceden a la acumulación de proteínas de reserva.

C O N T E N I D O

	PAG.
- RESUMEN	I
- CONTENIDO	II
- INTRODUCCION	1
- ANTECEDENTES	3
- POLINIZACION.	5
- DESARROLLO DEL EMBRION	5
- EMBRIOGENESIS SOMATICA	8
- PROBLEMATICA DE LA EMBRIOGENESIS SOMATICA	8
- PROTEINAS DE RESERVA	11
- TECNICAS ANALITICAS PARA EL ESTUDIO DE PROTEINAS.	12
- JUSTIFICACION	15
- OBJETIVOS	17
- METODOLOGIA	
- MATERIAL BIOLÓGICO.	18
- OBTENCION DEL MATERIAL SOMATICO	18
- TECNICA PARA LA DESINFESTACION DEL MATERIAL BIOLÓGICO	18
- TECNICA DE CULTIVO <u>IN-VITRO</u>	18
- CONVERSION DE LOS EMBRIONES SOMATICOS	19
- TECNICA PARA LA EXTRACCION DE PROTEINAS DE SEMILLAS Y EMBRIONES SOMATICOS.	19
- TECNICA PARA LA CUANTIFICACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE BRADFORD	20
- TECNICA PARA LA SEPARACION DE LOS DIFERENTES ESTADIOS DE DESARROLLO DE LOS EMBRIONES SOMATICOS POR CENTRIFUGACION EN UN GRADIENTE DISCONTINUO DE SACAROSA	22

- TECNICA DE ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA	23
- EXPERIMENTO PARA LA OBTENCION DE EMBRIONES CIGOTICOS CON DIFERENTES GRADOS DE MADUREZ.	23
- EXPERIMENTO PARA EL ESTUDIO DE EL EFECTO DE LA INCORPORACION DE EXTRACTOS AL MEDIO DE CULTIVO	24
- PARAMETROS EVALUADOS EN CADA UNO DE LOS TRATAMIENTOS	28
- RESULTADOS Y DISCUSION	29
- OBTENCION DE EMBRIONES CIGOTICOS CON DIFERENTE GRADO DE MADUREZ	30
- SEPARACION DE LOS DIFERENTES ESTADIOS DE DESARROLLO DE LOS EMBRIONES SOMATICOS POR CENTRIFUGACION EN GRADIENTE DISCONTINUO DE SACAROSA	35
- EFECTO DE LA INCORPORACION DE EXTRACTOS AL MEDIO DE CULTIVO	39
- CONCENTRACION DE ALBUMINAS EN CADA UNO DE LOS TRATAMIENTOS	45
- CONCENTRACION DE GLOBULINAS EN CADA UNO DE LOS TRATAMIENTOS	49
- EXPRESION DE LAS PROTEINAS DE RESERVA EN CADA TRATAMIENTO.	51
- CONVERSION DE LOS EMBRIONES OBTENIDOS EN CADA TRATAMIENTO	60
- ANALISIS HOLISTICO DE EL EFECTO DE LA ADICION DE CADA UNO DE LOS EXTRACTOS AL MEDIO DE CULTIVO	63
- CONCLUSIONES	66
- SUGERENCIAS.	68
- BIBLIOGRAFIA	69
- APENDICES	73

I N T R O D U C C I O N

Las plantas constituyen el primer eslabón de la cadena trófica. El hombre depende directa o indirectamente de las plantas para su alimentación y para la satisfacción de otras necesidades (Fowler, 1983). Esto lo ha llevado a obtener, mediante largos procesos de selección, variedades de plantas modificadas en características específicas como son la productividad, adaptabilidad a condiciones adversas y resistencia a plagas y enfermedades. Sin embargo los procesos de selección y desarrollo de nuevas variedades son, hasta cierto punto, al azar lo cual implica una gran cantidad de esfuerzo y tiempo invertidos.

Las nuevas técnicas de ingeniería genética podran permitir en el futuro manejar el mejoramiento genético y la obtención de nuevas variedades, con características deseables, en un menor tiempo y de una manera menos aleatoria. Sin embargo, para poder manipular la composición genética de un individuo y lograr que las modificaciones hechas al genoma sean expresadas, se requiere un conocimiento profundo de los mecanismos que regulan la expresión genética. Estos mecanismos son un punto clave ya que son los encargados de permitir que genes que se encuentran en todas las células de un individuo se expresen diferencialmente. En la actualidad se desconoce mucho sobre los mecanismos que regulan la expresión genética (Larkins, 1983). Este desconocimiento es lo que ha constituido uno de los principales obstáculos para la comprensión de los fenómenos de diferenciación en plantas; así como para el desarrollo de nuevos individuos con características genéticas mejoradas mediante la aplicación de la ingeniería genética.

Existe otra técnica que puede coadyuvar en el desarrollo de nuevas variedades de plantas en un tiempo menor (Fujii, et.al., 1992). Esta técnica es el cultivo de tejidos vegetales (CTV). En el CTV se tienen una serie de ventajas como son:

- Independencia de factores ambientales y variaciones estacionales;
- Producción controlada en cuanto a calidad y cantidad, así como condiciones de cultivo perfectamente definidas; y
- Menor requerimiento de espacio (Fowler, 1983).

Estas características dan la posibilidad de diseñar experimentos que permitan conocer la influencia de las condiciones ambientales y otros factores sobre el tejido cultivado. Mediante el CTV ha sido posible obtener embriogénesis somática en diversas especies (Crouch, 1982). Una de estas especies es la alfalfa (Medicago sativa L.) la cual se ha constituido en un sistema modelo para el estudio, a nivel bioquímico, de la embriogénesis somática. Esto es muy importante ya que se han realizado pocos estudios enfocados a los cambios bioquímicos que ocurren durante la etapa de embriogénesis (Krochko et al., 1992). Además, en México como en muchos otros países, la alfalfa es el cultivo forrajero más importante para la alimentación de rumiantes y es considerada por

muchos investigadores como la mejor forrajera del mundo. Esto es importante ya que México importa una gran cantidad de semilla mejorada para satisfacer las necesidades en esta área. Un ejemplo de esto es la alfalfa, de la cual el 90% de las semillas utilizadas en la producción de plantas para forraje son importadas (García de los Santos, 1987).

Los embriones somáticos presentan una serie de similitudes morfológicas con los embriones cigóticos (Hernandez, 1989; Rojas, 1991; Krochko et al., 1992) que han hecho manejar la posibilidad de producir semillas artificiales (Fujii, 1992). Sin embargo, existen diferencias entre los embriones somáticos y cigóticos que se han constituido en obstáculos para lograr la producción de tales semillas artificiales. Una de estas diferencias es la acumulación de material de reserva (Stuart et al, 1988; Rojas, 1991; Krochko et al., 1992), lo cual constituye la base alimenticia del embrión desde que inicia su germinación hasta que adquiere su capacidad autótrofa (Ashton, 1976; Larkins, 1981). Se desconoce la causa de esta diferencia y se cree que está relacionada con una falta de expresión de los genes implicados en la síntesis de tales materiales, ya que estos genes son expresados únicamente durante la formación de la semilla (Villegas, 1991; Krochko et al., 1992).

Existen teorías que implican factores epigenéticos en la regulación de la expresión genética (Villegas, 1991). De poderse identificar uno o varios de tales factores que permitan aumentar el contenido de materiales de reserva se daría un paso muy importante en el camino hacia la producción de semillas artificiales. Además, si en el futuro se conjuntan diversas técnicas como es el fitomejoramiento tradicional, la ingeniería genética y el cultivo de tejidos vegetales será factible la obtención de variedades mejoradas en tiempos bastante más cortos que los requeridos actualmente.

ANTECEDENTES

El hombre, como todo ser vivo, depende de los recursos que le rodean. Uno de los recursos más abundantes son las plantas, las cuales constituyen el inicio de la cadena trófica. Sin las plantas sería casi imposible la existencia de vida tal y como la conocemos. Esto debido a que son las plantas los principales organismos capaces de transformar la energía luminosa que proviene del sol, en energía utilizable por los organismos que integran el resto de la cadena trófica.

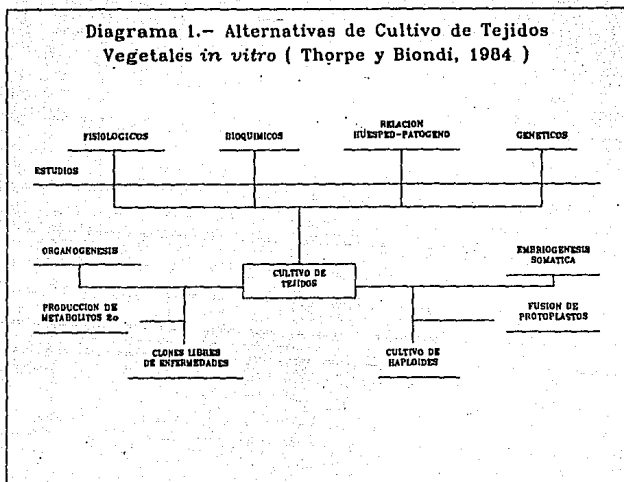
De igual modo, las plantas y los recursos naturales han jugado un papel preponderante y decisivo en la historia de la humanidad. Uno de estos momentos clave en la evolución del hombre fué el dominio de la agricultura, ya que ésta le permitió establecerse en un lugar determinado dejando atrás la etapa nómada para dedicarse a producir parte de sus requerimientos alimenticios. Con el tiempo, la capacidad de observación del ser humano le llevó a percibir que dentro de cada cosecha podía encontrar plantas o frutos con diferente vigor, productividad e incluso sabor. Esto le condujo, a lo largo de los siglos, a desarrollar estrategias que le permitieran seleccionar y obtener mejores y más abundantes cosechas. De igual modo encontró que no todas las plantas que propagaba por semilla retenían las características deseadas y esto, conjuntamente con otras características propias de las diferentes plantas que empleaba, le obligó a desarrollar otras técnicas de propagación como el acodado, el estacado, etc.

En el presente siglo, las necesidades alimentarias de la humanidad se han incrementado notoriamente y, se ha hecho necesario desarrollar nuevas técnicas de propagación que sean más eficientes y rápidas. Dentro de las técnicas desarrolladas con estas características se encuentra el CTV. Esta técnica se basa en que todas y cada una de las células de una planta poseen la información genética completa del individuo. Esto las constituye en células potencialmente capaces de dar lugar a la formación de un nuevo individuo, con las mismas características del organismo del cual las células fueron tomadas (Salisbury y Ross, 1985). Esta técnica ha ido avanzando tanto en sus logros como en su aplicación. Actualmente se emplea no sólo con fines de propagación sino también en el estudio de diferentes aspectos de los vegetales mediante el empleo de sistemas modelo. En el diagrama 1 se muestra un conjunto de aplicaciones del CTV.

Para comprender de una mejor manera cómo se emplea esta técnica es necesario revisar, de manera general, las rutas y vías que se pueden seguir.

En el CTV existen dos tipos de respuesta o rutas, las cuales son la organogénesis y la embriogénesis somática. La organogénesis consiste en la formación de estructuras aéreas o radicales a partir de un explante dado. En esta ruta se forma, por lo general, sólo una de las partes de la planta a la vez haciéndose necesario el trasplante de la estructura obtenida, a otro medio de cultivo diferente y/o con diferentes reguladores de

Diagrama 1.- Alternativas de Cultivo de Tejidos Vegetales *in vitro* (Thorpe y Biondi, 1984)



crecimiento, para lograr el desarrollo de la otra parte de la planta. Por otro lado, la embriogénesis somática consiste en el desarrollo de estructuras similares a las del embrión cigótico a partir de tejido somático. Las estructuras obtenidas poseen tanto el meristemo apical como el radical (Meijer y Brown, 1987).

En las dos rutas descritas anteriormente existen dos vías posibles: la directa y la indirecta. En la primera de ellas las estructuras se forman a partir del explante sin la necesidad de un previo crecimiento masivo de las células del explante. En la vía indirecta se requiere de una proliferación masiva del tejido antes que se de la formación de la estructura de propagación. A dicho crecimiento masivo de células, sin una función metabólica y estructural similar a las de una estructura definida, se le denomina callo (Thorpe, 1981).

La vía indirecta implica, en una primera fase, la generación y/o propagación de células indeterminadas metabólicamente que poseen características meristemoides las cuales dan lugar, en una segunda fase, a células determinadas bioquímica y metabólicamente y que constituyen a la estructura deseada. En la vía directa las células indeterminadas se encuentran ya presentes en el explante, y requieren sólo de una pequeña etapa de proliferación y la inducción de su determinación hacia la estructura deseada (Sharp et al., 1980).

POLINIZACION

Para que se de la formación de un embrión cigótico es necesario que la planta posea estructuras reproductoras maduras y funcionales. Durante la polinización el polen es transferido de la antera al estigma. Una vez que el polen ha alcanzado el estigma, germina y el tubo polínico alcanza el saco embrionario y se da la fertilización.

El tubo polínico crece hacia el estilo y entra en el ovario creciendo a lo largo de la pared y hasta el funículo. Usualmente entra al óvulo a través del micrópilo. El tubo polínico continúa creciendo por la nucela y alcanza el saco embrionario. Aquí el tubo penetra una de las dos sinérgidas y descarga los dos núcleos espermáticos. Uno de ellos entra a la ovocélula fusionándose y produciendo un cigoto (Raghavan, 1976). El otro núcleo espermático se fusiona con los núcleos polares y se forma el núcleo primario del endospermo. Este proceso se da sólo en las angiospermas y es conocido como doble fertilización. El resultado de la doble fertilización es un cigoto diploide y el endospermo generalmente triploide (fig. 1) (Jensen y Salisbury, 1984).

DESARROLLO DEL EMBRION

Una vez producida la fertilización se dan una serie de cambios extensivos y progresivos a partir de diferentes estados de diferenciación. A esta serie de cambios se le conoce como embriogénesis.

Como resultado de la embriogénesis se obtienen tejidos y órganos que constituyen al embrión. Los cambios en el patrón de arreglo celular dan como resultado cambios en la talla y forma del embrión; estos cambios están determinados por los planos de división celular y el grado y dirección de la elongación celular (Raghavan, 1976).

En las fases iniciales de la embriogénesis el cigoto se divide en forma desigual dando como producto una célula pequeña, la que dará lugar al futuro embrión y una célula basal grande que, por división limitada, da lugar al suspensor. El suspensor es una estructura que funciona como conductor de material nutritivo necesario para el embrión.

La célula pequeña o célula terminal se divide continuamente y da lugar a una masa globular de células. A partir de ella se diferencia el dermatógeno. Posteriormente dos centros de división dan lugar al surgimiento de los cotiledones formando un embrión en forma globular. Divisiones posteriores producen la formación de un embrión en estado de torpedo. En este momento las regiones apicales del brote y de la raíz están claramente definidas y los inicios de la diferenciación celular pueden observarse claramente (fig. 2) (Jensen y Salisbury, 1984).

Otra etapa importante en la formación de la semilla es la acumulación de material de reserva, la cual se da en los cotiledones. El desarrollo de los cotiledones se inicia al alcanzarse el número final de células del embrión. Este número se alcanza rápidamente durante la ontogenia. Los cambios posteriores a este punto son debidos a un incremento en la masa y/o volumen

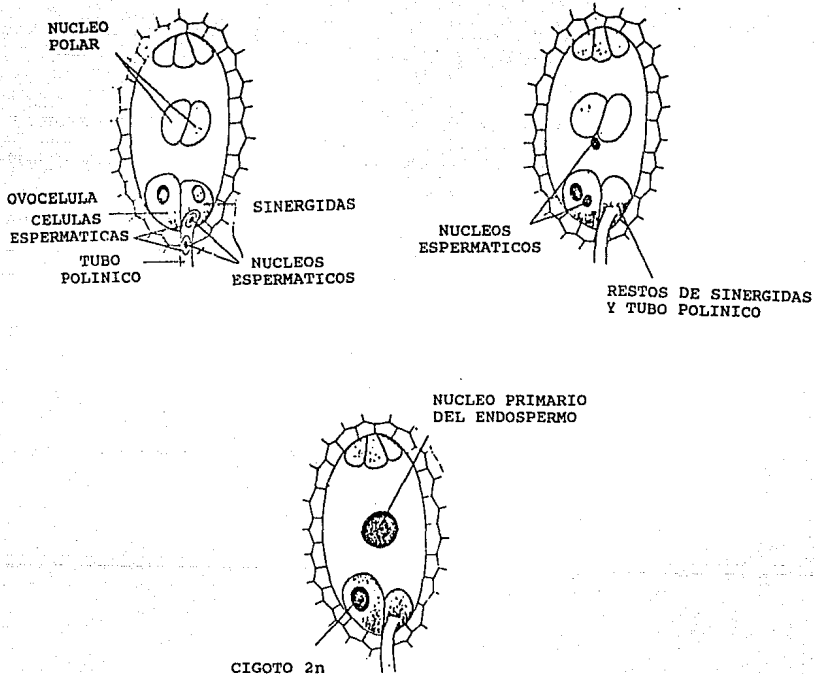


Figura 1.- Eventos de la doble fertilización (tomado de Jensen y Salisbury, 1984).

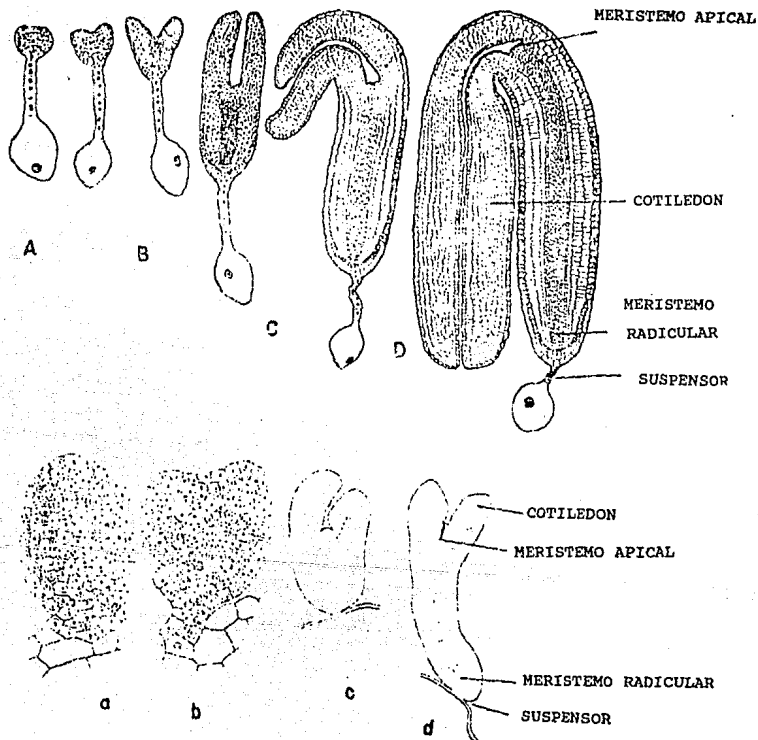


Figura 2.- Ontogenia de los embriones cigóticos (A-D) y somáticos (a-d). A y a = etapa globular; B y b = corazón; C y c = torpedo y D y d = cotiledonar (Raghavan, 1976).

anterior y existen estudios como los de Sangduen (citado por Rojas, 1991) con dos especies de alfalfa: Medicago sativa y M. esculenta encontrando etapas de crecimiento similares en los células, dado por la acumulación de materiales de reserva (proteínas, almidones, etc.) (fig. 3) (Millerd, 1973).

La embriogénesis sexual de alfalfa se apega a la descripción embriones de estas dos especies.

La embriogénesis somática muestra un paralelismo con el desarrollo de la embriogénesis sexual. Esto ha sido demostrado por varios estudios (Stuart et al., 1985; Crouch and Sussex, 1981; Hernández, 1989; Rojas, 1991; Krochko, et.al., 1992) que muestran claramente que los embriones somáticos pasan por los estadios: globular, de corazón, de torpedo joven y cotiledonar o torpedo maduro.

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

La embriogénesis somática consiste en el desarrollo de estructuras bipolares que presentan estructura, función y metabolismo comparables con las presentadas por el embrión cigótico (Meijer y Brown 1987). Estas estructuras se denominan bipolares por la presencia tanto del polo radical como del apical. Estas características le dan la capacidad de formar tanto la parte aérea como la raíz de una planta. A este proceso de formación de una planta a partir de embriones somáticos lo denominaremos conversión para diferenciarlo del proceso de germinación de las semillas (Fujii, et.al., 1992).

Para lograr la Embriogénesis Somática se ha encontrado un patrón general a seguir (Thorpe, 1981). El procedimiento consiste en la aplicación de un choque auxínico (algunas ocasiones además de la auxina se adiciona otro regulador de crecimiento, con frecuencia se emplean citocininas) al tejido durante un lapso de tiempo determinado (denominado fase o período de INDUCCIÓN) después del cual el tejido es transplantado, a un medio de cultivo libre de reguladores de crecimiento (fase de DESARROLLO). Sobre este patrón se hacen modificaciones de acuerdo a la especie que se esté trabajando. Estas modificaciones consisten, principalmente, en cambios en la concentración y relación de los reguladores de crecimiento empleados así como en algunas condiciones ambientales, tales como el fotoperíodo. Se han hecho esfuerzos por homogenizar este procedimiento, sin embargo esto no ha sido posible. A pesar que se ha reportado la embriogénesis somática en un número diverso de especies, tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas (Crouch, 1982; Meijer y Brown, 1987), existen especies en las cuales esta ruta no se ha logrado expresar. Debido a esto es preciso desarrollar investigaciones que permitan conocer en mayor detalle los procesos que ocurren en el tejido durante las fases de inducción y desarrollo de la embriogénesis somática.

PROBLEMATICA DE LA EMBRIOGENESIS SOMATICA

La obtención de embriogénesis somática en diversas especies ha planteado la posibilidad de emplearla como sistema modelo que

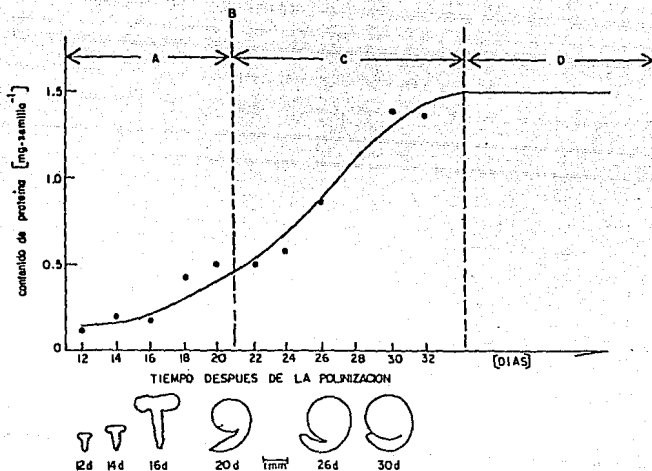


Figura 3.- Acumulación de proteína y desarrollo morfológico de los embriones en la maduración de la semilla de mostaza (tomado de Villegas, 1986).

- A.- División celular rápida. Crecimiento de la testa y el endospermo. Síntesis de precursores.
 B.- Cesa la división celular.
 C.- Almacenamiento de material de reserva.
 D.- Desecación.

permita conocer los procesos que ocurren durante la embriogénesis sexual. Al emplear la embriogénesis somática para estos estudios podrían superarse los problemas de obtención y manejo de embriones cigóticos en condiciones controladas (Crouch, 1982; Chasan, 1992). Es necesario conocer primero la similitud que guarda este proceso de embriogénesis somática con el de embriogénesis sexual (Crouch, 1982).

A pesar de las similitudes morfológicas existentes entre los dos tipos de embriones existen diferencias en su desarrollo (Hernández, 1989; Rojas, 1991; Krochko, et al., 1992). Las diferencias más notables implican un desarrollo pobre de las células que componen los cotiledones así como una falta de acumulación de proteínas de reserva y la falta de latencia en los embriones somáticos (Stuart, et al., 1988; Hernández, 1989; Rojas, 1991; Cibrián, 1991; Villegas 1991; Krochko, et al., 1992).

Estudios recientes han ampliado el conocimiento en esta área, pero aún se desconocen muchos aspectos del desarrollo embrionario en general (Larkins, 1983; Krochko, et al., 1992). Dentro de las diferencias más notables están comprendidas dos que se han constituido en las principales limitantes para la producción de semilla artificial: los embriones somáticos no almacenan gran cantidad de proteínas de reserva (Crouch, 1982; Rojas, 1991; Cibrián, 1991) y tampoco se les puede almacenar como a las semillas (Fujii et al., 1992).

Tradicionalmente se ha considerado que la falta de almacenamiento de proteínas de reserva reduce las expectativas de germinación de la semilla pues son los materiales de reserva los encargados de proporcionar los nutrientes requeridos por el embrión durante el proceso de germinación (Bewley y Black, 1982). En lo que respecta a la incapacidad de sobrevivir en almacenaje esta puede estar relacionada al proceso de latencia o a la deshidratación de la semilla (Bewley y Black, 1982; Krochko, et al., 1992). La característica de factibilidad de almacenaje es muy importante para los intereses del ser humano ya que esto le permite almacenar y transportar la semilla así como sembrarla en épocas y/o condiciones favorables para el desarrollo de la planta. Al no existir este fenómeno en el embrión somático, la conversión se constituye en un paso obligado y por lo tanto se reducen las ventajas que la producción de semillas ha ofrecido al hombre tradicionalmente.

Por otro lado, existen diferencias morfológicas como es la proporción embrión/cotiledones. En la semilla, el cuerpo del embrión es muy pequeño comparado con el tamaño de los cotiledones (Lee, 1985; Craig et al., 1989). En los embriones somáticos los cotiledones presentan un escaso desarrollo y el embrión constituye la mayor parte de la estructura formada (Hernández, 1989; Rojas, 1991; Cibrián, 1991; Krochko et al., 1992). Esta diferencia está relacionada con el almacenamiento de material de reserva, pero no se sabe si la falta de desarrollo de los cotiledones en el embrión somático es causa o consecuencia de la falta de acumulación de proteínas de reserva.

Otras diferencias entre los embriones cigóticos y somáticos

son el color y la consistencia. La semilla madura es de color amarillo y presenta una consistencia dura y seca. El embrión somático presenta un color verde y una consistencia suave así como un gran contenido de agua.

PROTEINAS DE RESERVA

Las semillas presentan diferentes materiales de reserva como son las proteínas, almidones y lípidos. Estos materiales constituyen la fuente alimenticia del embrión durante la germinación y hasta que está en condiciones de realizar la fotosíntesis (Ashton, 1976; Larkins, 1981, 1983).

Estos materiales de reserva también son importantes para el hombre ya que utiliza las semillas como alimento y éstas constituyen la base alimenticia de muchos pueblos en el mundo. Así, al ser los materiales de reserva los principales nutrientes en la semilla, estos materiales se constituyen en la base nutricional de dichos pueblos (Larkins, 1981).

Existe otro enfoque interesante en los materiales de reserva y en especial de las proteínas de reserva. Este consiste en realizar estudios sobre la expresión genética diferencial (Sun et al., 1978; Rojas, 1991; Villegas, 1991). El enfoque se basa en el hecho de que las proteínas de reserva son expresadas en la planta únicamente durante la formación de semillas y se les localiza únicamente en la semilla (Sun et al., 1978; Croissant-Sych y Bopp, 1988). Estudios realizados con tejidos de diferentes partes de las plantas así lo confirman (Villegas, 1991; Krochko et al., 1992).

Durante la embriogénesis cigótica se pueden definir dos fases de crecimiento. La primera fase consiste de una intensa división celular. La segunda fase se caracteriza por constituir un período de gran crecimiento celular. Durante este crecimiento se sintetizan los materiales de reserva (Lee, 1985).

En un embrión existen dos tipos de proteínas: las metabólicas y las de reserva. Las proteínas metabólicas pueden ser enzimáticas o estructurales y se relacionan con la actividad basal normal de la célula. Es decir, son las proteínas básicas para mantener viva a la célula. Las proteínas de reserva, junto con otros materiales de reserva como los carbohidratos y los lípidos, son sintetizados únicamente durante el desarrollo de la semilla (Sun et al., 1978; Larkins, 1981; Villegas, 1986).

Se puede definir a las proteínas de reserva como proteínas que son sintetizadas y acumuladas en cantidades significativas durante el desarrollo de la semilla con la finalidad de proporcionar una fuente de nitrógeno reducido durante los estadios tempranos del crecimiento de la planta (Higgins, 1984; Craig et al., 1989).

En los cereales las proteínas de reserva constituyen aproximadamente el 10% del peso seco de la semilla. En leguminosas el porcentaje de proteínas de reserva con respecto al total del peso seco de la semilla varía entre el 20 y el 30% (Larkins, 1983).

Las proteínas se pueden clasificar, de acuerdo con su solubilidad, en cuatro clases:

- Albúminas : solubles en agua ;
- Globulinas : solubles en soluciones salinas ;

- Prolaminas : solubles en soluciones alcoholicas ; y
- Glutelinas : Solubles en soluciones acidas o alcalinas (Ashton, 1976 y Larkins, 1983)

En la mayoría de las dicotiledóneas las proteínas de reserva son de la clase de las globulinas. En tanto que en las monocotiledóneas son de las clases de prolaminas y glutelinas aunque existen excepciones (Higgins, 1984).

Las globulinas se dividen, de acuerdo con su coeficiente de sedimentación en gradiente de sacarosa, en dos grupos principales: 7S y 11S. En realidad las 7S abarca proteínas cuyos coeficientes van de 7 a 9S, mientras que las 11S comprende proteínas del rango 10-14S. Ambas clases son oligoméricas, con estructura cuaternaria basada en trimeros o múltiplos de trimeros. En el cuadro 1 se resumen las características específicas de las proteínas de reserva de alfalfa (tomado de Villegas, 1991).

Las proteínas de reserva de leguminosas son almacenadas en la célula en forma insoluble en estructuras denominadas cuerpos proteicos. Estas estructuras se localizan en las vacuolas de las células de los cotiledones y, en menor grado, en las células del embrión (Larkins, 1983; Craig et al., 1989; Rojas, 1991). Los cuerpos proteicos presentan un diámetro aproximado que varía de 1 a 20 μm y están rodeados por una membrana sencilla (Higgins, 1984).

Se desconoce aún la ruta de síntesis y almacenamiento de las proteínas de reserva pero se cree que son sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso, luego transferidas al aparato de Golgi y de ahí exportadas a la vacuola (Larkins, 1983; Craig et al., 1989).

Se sabe que las proteínas de reserva presentan una sorprendente homología a pesar de que se obtengan de grupos evolutivamente diversos como son las leguminosas y las cucurbitáceas. También se sabe que son codificadas por familias de multigenes (Higgins, 1984; Villegas, 1991).

Los mecanismos que regulan de una manera tan precisa, tanto en el espacio como en el tiempo, la expresión de estas familias de genes aún se desconocen. Existen investigadores que apoyan teorías sobre el control interno de los mecanismos implicados en la síntesis de las proteínas de reserva (Croissant-Sych y Bopp, 1988). En contraparte otros investigadores proponen un sistema regulado por factores internos y externos, así como epigenéticos (Higgins, 1984; Villegas, 1991).

TECNICAS ANALITICAS PARA EL ESTUDIO DE PROTEINAS

Existen diversas técnicas empleadas con este fin. La electroforesis es una técnica que nos permite separar proteínas de acuerdo a su tamaño y/o carga, mediante la aplicación de un campo eléctrico. (Hames y Rickwood, 1981).

Cualquier ión o grupo químico que posea carga se mueve, en un campo eléctrico, hacia el polo que posee carga opuesta. Las proteínas poseen una carga neta, cuando no están en su punto isoeléctrico, lo cual permite que migren.

La migración depende de dos factores: el tamaño de la molécula

CUADRO 1.-CARACTERISTICAS DE LAS PROTEINAS
DE RESERVA, 7S Y 11S, DE ALFALFA.

CARACTERISTICA	7S	11S
SOLUBILIDAD A pH = 7	SOLUBLE CON BAJA FUERZA IONICA NaCl = 0.2 M	SOLUBLE CON ALTA FUERZA IONICA NaCl = 1.0 M
SOLUBILIDAD A pH = 3 0 9	INSOLUBLE	SOLUBLE CON BAJA FUERZA IONICA
PESO MOLECULAR	150 KD	360 KD
PUNTO ISOELECTRICO	5.8	4.75
ORIGEN DE FAMILIAS DE MULTIGENES CON DIFERENTES PM Y pI	SI	SI
EST. CUATERNARIA	HETEROGENEA	HOMOGENEA
Nº DE SUBUNIDADES	3 (PROBABLE)	6
ARREGLO DE LOS POLIPEPTIDOS	FAMILIAS DE VARIOS CON ESTEQUIOMETRIAS DIFERENTES	FAMILIAS DE UNO ESTEQUIOMETRIAS IGUALES
PRODUCTO DE TRANSCRIPCION	70 KD (PROBABLE)	50-60 KD
MODIFICACION POSTRADUCCIONAL	PROTEOLISIS MULTIPLE GENERA POLIPEPTIDOS DE 54, 51, 39, 36, 32 Y 20 KD	PROTEOLISIS ESPECIFICA GENERA POLIPEP. DE 45 Y 20 KD
PRESENCIA DE PUENTES DISULFURO	NO	SI
PROPORCION N / S	ALTA	BAJA
TEMP. COAGULACION	ALTA (ESTABLE)	BAJA (INESTABLE)
DIST. FILOGENETICA	LEGUMINOSAS	DICOTILEDONEAS Y ALGUNAS MONOCOT.

y de las diferencias de cargas que poseen las diferentes proteínas contenidas en una muestra, lo cual permite separar a las proteínas aprovechando su migración diferencial.

Lo anterior es el fundamento de la electroforesis. En esta técnica se pueden emplear diferentes medios de soporte como son el papel, gel de sílice, o geles de agarosa, almidón, poliacrilamida, etc..

Los geles pueden tener dos funciones, servir como soporte y, en algunos casos, intervenir en la separación de las proteínas. Esta última función se debe a que son considerados como medios porosos lo cual puede permitir la migración de proteínas pequeñas e interferir con la de proteínas grandes. Este efecto sobre la migración de las proteínas dependerá del poro que se elija al preparar el gel. Con esta característica es posible separar dos o más proteínas con idéntica densidad de carga pero con diferente tamaño. Este principio es el más utilizado al emplear geles de poliacrilamida. La solución más empleada en éste tipo de geles es la de Fosfatos-SDS. La adición del SDS a la solución amortiguadora y a la muestra preparada permite que todas las proteínas posean carga negativa y migren hacia el polo positivo. Así se direcciona la migración de las proteínas y la separación que se logra depende de la densidad de carga propia de la proteína, del tamaño de la molécula y del poro del gel.

Para realizar la electroforesis se requiere de una solución amortiguadora con la finalidad de mantener un pH constante, ya que una variación en éste podría influir en la migración de las proteínas. Los límites de pH varían y el valor se elige tratando de evitar reacciones hidrolíticas en las muestras a analizar, tales como la desaminación.

Las proteínas pueden ser estudiadas en su forma nativa o desnaturalizadas. Una de las formas más empleadas es la desnaturalizada en la cual se emplean sustancias que rompen los puentes disulfuro presentes en la molécula de proteína. Un ejemplo de estas sustancias es el β -mercaptoetanol.

Teniendo en consideración lo anterior, se deben elegir las condiciones para la electroforesis. Para visualizar el patrón electroforético se recurre a efectuar una tinción del gel, la cual puede ser realizada con azul de Coomassie o con plata.

Con el gel ya teñido se puede conocer las migraciones relativas de cada una de las proteínas de una muestra. Si además se incluyeron, en un carril aparte, proteínas de peso molecular conocido es posible conocer el peso molecular aproximado de cada una de las proteínas que se hayan separado en el gel.

La técnica de electroforésis ha sido empleada en la identificación y caracterización de las proteínas de reserva con gran éxito (Sun et al., 1978; Crouch, 1982; Larkins, 1983; Lee, 1985; Croissant-Sych y Bopp, 1988; Rojas, 1991; Villegas, 1991).

J U S T I F I C A C I O N

La alfalfa es un miembro de la familia Leguminosae y constituye el principal cultivo forrajero en Norteamérica (García de los Santos, 1987). En nuestro país se encuentra ampliamente distribuida, principalmente entre los 1500 y 2500 msnm. A nivel del mar el cultivo de esta planta también prospera como es el caso de Baja California y Sonora debido al clima de estas zonas. Según datos del INIFAP y SARH es el tercer cultivo perenne de acuerdo al número de estados que lo producen y es superado solo por el aguacate y la naranja (Villegas, 1991).

Para garantizar el abasto de esta leguminosa se requiere del cultivo de plantas para la producción tanto de forraje como de semillas (García de los Santos, 1987; Villegas, 1991).

Debido a la importancia comercial y alimenticia de la alfalfa se requiere el desarrollo de nuevas variedades mejoradas en los aspectos de productividad, adaptabilidad así como resistencia a plagas y enfermedades. Esto constituye retos que son superados mediante las técnicas de mejoramiento genético tradicionales; sin embargo una desventaja de dichos métodos es que los períodos de tiempo que se requieren son extremadamente largos.

Otra dificultad a salvar, en el cultivo de alfalfa, es la producción en cantidades suficientes de semillas de las variedades mejoradas, una vez que éstas se tienen, ya que México importa el 90% de la semilla requerida para este cultivo (García de los Santos, 1987).

Es en este último aspecto en el cual el CTV puede desempeñar un papel muy importante, a través de la embriogénesis somática. Esto es debido a que existe la posibilidad, no muy distante, de producir semilla artificial con la ventaja de obtener plantas clonadas. Esto garantiza la retención y expresión de características genéticas recesivas favorables. Esta técnica también puede contribuir al acortamiento de los períodos requeridos para la obtención de variedades mejoradas así como a optimizar la calidad de la semilla producida (Fujii et al., 1992).

Sin embargo existen aún limitantes importantes para el desarrollo de la producción de semillas artificiales. Los dos principales puntos a superar son: la acumulación de material de reserva y la latencia de la semilla. La acumulación de material de reserva, en particular proteínas de reserva en las leguminosas, se ha relacionado tradicionalmente con la capacidad de germinación de las semillas (Villegas, 1991). Así, si una semilla posee poco material de reserva se considera de baja calidad con respecto a otra con un mayor contenido de estos materiales. Así mismo se esperará un mayor porcentaje de germinación de la semilla con mayor contenido de dichos materiales. Considerando lo anterior y el hecho de que los embriones somáticos acumulan poco material de reserva, se podría catalogar a los embriones somáticos como "semillas de baja calidad".

El segundo punto a superar es la falta de latencia en los embriones somáticos. Esto es muy importante ya que una de las

principales características de las semillas es que, muchas de ellas y en particular las que son de importancia alimenticia para el hombre, se puedan almacenar. Esto ha constituido una ventaja para el hombre pues le permite tener semillas en reserva, decidir si se emplearán para la producción de plantas o para consumo humano. También le permite realizar una distribución geográfica de las semillas de acuerdo a sus necesidades. Considerando lo anterior, si los embriones somáticos no entran en latencia, todas las ventajas que ofrecen las semillas al hombre se pierden y, por lo tanto, se cancela la posibilidad de la producción de semilla artificial.

Para poder superar estas limitantes es necesario conocer más acerca de los mecanismos de regulación de la expresión genética del material de reserva y de los factores que inducen la latencia en las semillas. Esto permitiría saber lo que está ocurriendo o falta por ocurrir en los embriones somáticos y que no permite que éstos se comporten como una semilla.

El CTV brinda la posibilidad de establecer sistemas modelo para el estudio y comparación de ciertos procesos que se llevan a cabo en los fenómenos de propagación (Crouch, 1982; Stuart, et al., 1988; Villegas, 1991). Si consideramos las ventajas y limitantes de la producción de semillas artificiales además de la importancia de las leguminosas (directa o indirectamente) en la alimentación humana, podemos comprender la importancia que tiene el sistema modelo de embriogénesis somática en alfalfa.

El sistema de embriogénesis somática de alfalfa presenta una serie de características ventajosas como son las siguientes:

- Metodología bien establecida y reproducible;
- Alta productividad de embriones somáticos; y
- Alto grado de paralelismo morfológico de los embriones somáticos con respecto a los embriones cigóticos.

Por lo anteriormente señalado se decidió trabajar en el sistema de embriogénesis somática de alfalfa, en particular sobre el contenido de proteínas de reserva.

O B J E T I V O S

GENERALES:

- * Determinar las semejanzas y diferencias en la expresión de proteínas durante la ontogenia de embriones somáticos y cigóticos.
- * Determinar la influencia de la incorporación al medio de cultivo de extractos de semilla con diferentes grados de madurez sobre el proceso de embriogénesis somática.

PARTICULARES:

- * Determinar los cambios en la acumulación de proteínas de reserva que ocurren durante el desarrollo de las semillas de alfalfa (Medicago sativa L. var. Puebla 76).
- * Determinar los cambios en la acumulación de proteínas de reserva que ocurren durante el desarrollo de los embriones somáticos de alfalfa (Medicago sativa L. var. Rangelander, línea A70.34).
- * Comparar la acumulación de proteínas de reserva durante la ontogenia de embriones somáticos y cigóticos de alfalfa.
- * Determinar el número de fracciones de embriones somáticos que se obtienen al someterlos a una separación por gradiente discontinuo de sacarosa, así como el estado de desarrollo en que se encuentran los embriones que integran cada fracción.
- * Determinar la concentración de albúminas y globulinas de cada una de las fracciones de embriones somáticos obtenidas por separación en gradiente discontinuo de sacarosa.
- * Determinar si existen variaciones en la expresión de proteínas de reserva al adicionar extractos de semillas al medio de cultivo.
- * Determinar el porcentaje de conversión de los embriones somáticos obtenidos en cada tratamiento.

M E T O D O L O G I A

MATERIAL BIOLÓGICO

Se trabajó con *Medicago sativa* L. var. Rangelander línea A 70.34 como fuente de material biológico para los estudios sobre embriones somáticos¹, y con semillas de *Medicago sativa* L. var. Puebla 76 para los estudios en embriones cigóticos².

OBTENCION DEL MATERIAL SOMATICO

Para la obtención de embriones somáticos se emplearon pecíolos de alfalfa (variedad Rangelander línea A 70.34) jóvenes, es decir que no fueran maduros, ya que esto influye en la respuesta (Villegas, 1991). Los pecíolos fueron cortados de la planta empleando una navaja filosa para evitar lesionar demasiado a la planta y el tejido.

TECNICA PARA LA DESINFESTACION DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Los pecíolos de *Medicago sativa* L. var. Rangelander línea A 70.34 (en adelante A 70.34) se desinfectaron lavándose 3 veces con agua jabonosa, posteriormente se enjuagaron y fueron colocados en una solución de hipoclorito de calcio al 4 % p/v durante 6 minutos con agitación constante. Una vez transcurrido ese tiempo se procedió a enjuagarlos 3 veces con agua destilada estéril.

Los pecíolos se colocaron en una caja de Petri estéril con un poco de agua destilada, también estéril, y se cortaron a un tamaño aproximado de 5-7 mm efectuándose posteriormente la siembra.

TECNICA DE CULTIVO IN-VITRO

Los medios que se emplearon fueron el B₅ (Villegas y Brown 1987, modificado de Gamborg, et.al., 1968) para la embriogénesis somática y el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) a un 50% de concentración de sales para la conversión de los embriones (apéndices 1 y 2).

El pH de los medios se ajustó a 5.5 ± 0.1 (B₅) y 5.8 ± 0.1 (MS). Este ajuste se realizó, con hidróxido de sodio 0.1 N y/o ácido clorhídrico 0.1 N, cuando el medio estaba completo y sólo faltaba agregar el agar.

El medio de cultivo empleado presentaba un estado físico de gel sólido el cual se logró con agar bacteriológico (Bioxón) en una relación de 9 gramos por litro de medio.

El medio de cultivo, el agua y todo el material utilizado se

¹Esta línea fue donada por el doctor Daniel C. W. Brown del Plant Research Center of Agriculture de la universidad de Carleton, Ottawa, Canada.

²El material de esta variedad fue proporcionado por el M. en C. Luis Castro Acero del campo experimental El Horno dependiente del INIFAP de la SARH, ubicado en el municipio de Texcoco, Edo. de México.

esterilizaron en autoclave a una presión de 20 libras/pulg² y 121°C de temperatura durante 30 minutos.

Los fragmentos de peciolo ya desinfectados y cortados se colocaron en frascos conteniendo medio de inducción (B₅ + 1 mg/l Ac. 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) + 0.2 mg/l Kinetina (Kin)). Al día 18 de cultivo se transplantaron los callos a medio de desarrollo (B₅ sin reguladores de crecimiento). Durante la sexta semana se efectuó la colecta y el rescate de los embriones (conversión³) en medio MS al 50% de concentración de sales (diagrama 2).

Las condiciones de incubación bajo las cuales se desarrollaron los cultivos fueron las siguientes: fotoperíodo de 16 hrs. luz /8 hrs. oscuridad; temperatura de 25 ± 3°C; intensidad lumínica de 350 lux. En los casos de los tratamientos en los que la fase de desarrollo se llevó a cabo en oscuridad las condiciones fueron iguales a excepción que los frascos fueron colocados dentro de una caja para evitar la incidencia de la luz.

CONVERSION DE LOS EMBRIONES SOMATICOS

La conversión de los embriones somáticos de alfalfa obtenidos de los diferentes tratamientos fué determinada en dos diferentes condiciones. La primera fué la tradicional que consiste en colocar los embriones en medio MS (1962) al 50% de su concentración de sales bajo las condiciones señaladas anteriormente.

La segunda condición probada fué con el medio anteriormente descrito pero adicionado con 2 g/l de extracto (albúminas) de semillas con 60 días de madurez.

Se tomaron los embriones presentes en un mínimo de 3 frascos por tratamiento y se colocó el 50% de el total en cada condición a probar.

La evaluación de la conversión se llevó a cabo a las 4 o 6 semanas después del transplante a medio de conversión.

TECNICA PARA LA EXTRACCION DE PROTEINAS DE SEMILLAS Y EMBRIONES SOMATICOS

Las fracciones de proteínas fueron extraídas con amortiguador de fosfatos pH=7 así como inhibidores de proteasas (Etilen dinitrilo tetracetato disódico (EDTA) y Fenil metil sulfonyl fluoruro (PMSF)). Para la extracción de la Albúminas se empleó este amortiguador simple, en tanto que para la de Globulinas se empleó el amortiguador adicionado con NaCl 1 M (Villegas, 1986).

La composición del amortiguador es la siguiente:

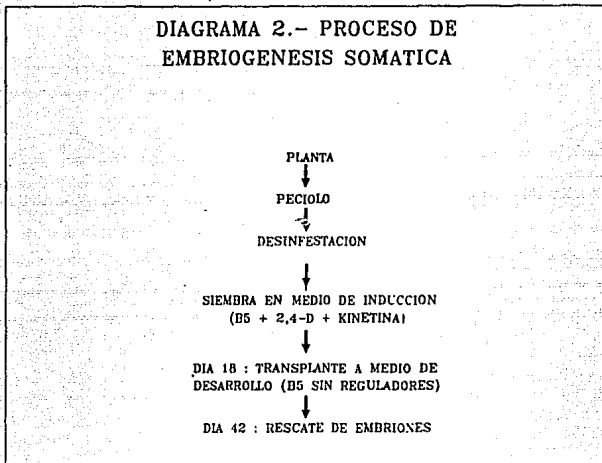
Fosfatos (monobásico y dibásico de sodio) 50 mM, PMSF 200 µM y EDTA 100 mM.

El proceso de extracción se efectuó en frío de acuerdo con lo

³Se emplea el termino conversión como sustituto de germinación para diferenciar el proceso que se da en el embrión somático del equivalente en el embrión cigótico (Villegas, 1991).

DIAGRAMA 2.- PROCESO DE EMBRIOGENESIS SOMATICA

20



indicado en el diagrama 3.

Los callos fueron sometidos, además de las extracciones de albúminas y globulinas, a extracciones exhaustivas para definir la cantidad y tipo de proteínas que quedaban retenidas en el botón. Para esto se tomaron los botones y se les adicionó 5 ml del amortiguador de muestra (ver apartado de electroforesis) sin colorante por cada gramo de peso de botón. Posteriormente los botones resuspendidos fueron hervidos dos veces durante lapsos de 2 minutos con agitación en vortex entre cada lapso. A continuación se centrifugaron los tubos y se tomó el sobrenadante al cual se le determinó el contenido de proteínas. Por último, se tomó una alícuota y se preparó la muestra para su corrimiento en gel de poliacrilamida.

TECNICA PARA LA CUANTIFICACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE BRADFORD (1976)

La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Bradford. Este método se basa en que el azul brillante de Coomassie G-250 presenta dos formas coloridas: una roja y una azul. El reactivo de Bradford presenta una coloración roja, y al unirse el colorante con el enlace peptídico de las proteínas se transforma a la coloración azul. Este cambio tiene un coeficiente de extinción

DIAGRAMA 3.- TECNICA PARA LA EXTRACCION DE PROTEINAS.
 PESAR EL TEJIDO (CALLO, EMBRION CIGOTICO O SOMATICO)

↓

EXTRACCION CON AMORTIGUADOR DE FOSFATOS SIMPLE
 (VOLUMEN EMPLEADO = 10 VECES EL PESO DEL TEJIDO)
 EN MORTERO FRIO Y CENTRIFUGAR 30 MINUTOS A 4000 g.

↓

SOBRENADANTE = FRACCION DE ALBUMINAS. GUARDAR EN CONGELACION.

BOTON: RESUSPENDER EN AMORTIGUADOR DE FOSFATOS SALINO

↓

CENTRIFUGACION A 4000 g DURANTE 30 MINUTOS

↓

BOTON : GUARDAR EN CONGELACION.

SOBRENADANTE= FRACCION DE GLOBULINAS. GUARDAR EN CONGELACION
 O PROSEGUIR PARA PURIFICACION DE PROTEINAS DE RESERVA.

↓

OBTENCION PROTEINAS DE RESERVA: DIALIZAR FRACCION DE GLOBULINAS
 CONTRA AMORTIGUADOR DE ACETATOS (50 mM; pH=4.75; 24 HORAS A 4°C)

↓

CENTRIFUGAR DIALIZADO A 13,000 g DURANTE 30 MINUTOS A 4°C.

↓

BOTON= FRACCION 11S. GUARDAR EN CONGELACION.

SOBRENADANTE : DIALIZAR (24 HORAS A 4°C CONTRA AGUA DESIONIZADA)

↓

CENTRIFUGAR DIALIZADO 30 MINUTOS A 13,000 g A 4°C

BOTON= FRACCION 7S. GUARDAR EN CONGELACION. DESECHAR SOBRENADANTE

muy alto lo que proporciona una alta sensibilidad en la cuantificación espectrofotométrica de proteínas.

Preparación del reactivo de Bradford

Se pesaron 200 mg de Azul de Coomassie G-250 y se disolvieron en 100 ml de etanol al 96% con agitación constante. Se adicionaron 200 ml de ácido fosfórico al 65% y se aforó a 2 lt. con agua bidestilada. Se filtró la solución en un papel Whatman #4 y se guardó en un frasco ámbar.

A continuación se procedió a obtener una curva tipo empleando una solución de albúmina de suero bovino (BSA) diluida en una solución de NaCl 0.15 M (concentración final : 1mg de BSA / ml de solución). La curva tipo se obtuvo al tomar diferentes alícuotas y llevarlas a un volumen final igual a 100 μ l tal como se describe a continuación:

μ l BSA	0	5	10	20	40	50
μ l NaCl	100	95	90	80	60	50

A cada muestra se le adicionaron 5 ml de reactivo de Bradford. Se agitó y se leyó la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro. Los valores obtenidos por triplicado nos dan una curva la cual fué ajustada por regresión lineal (Finney, 1980).

A los extractos obtenidos se les aplicó el mismo procedimiento, efectuando las lecturas por duplicado con la diferencia que se colocaron 10 μ l de muestra y 90 μ l de amortiguador de extracción para así obtener una alícuota de 100 μ l. La concentración de proteínas de las muestras se obtuvo por interpolación en la curva tipo.

TECNICA PARA LA SEPARACION DE LOS DIFERENTES ESTADIOS DE DESARROLLO DE LOS EMBRIONES SOMATICOS POR CENTRIFUGACION EN UN GRADIENTE DISCONTINUO DE SACAROSA

La embriogénesis somática es un proceso asincrónico lo que dificulta el análisis de cada uno de los diferentes estadios de desarrollo de los embriones somáticos (Fujimura y Komamine, 1979; Warren y Fowler, 1977), lo que hizo preciso recurrir a procedimientos físicos que permitieran obtener embriones con un grado similar de desarrollo. El método empleado para este fin fue el gradiente discontinuo de sacarosa.

En el presente trabajo se utilizó un gradiente discontinuo de sacarosa empleando soluciones al 30, 50 y 70 % p/v para lograr una buena separación entre las diferentes etapas embriogénicas, con lo cual se pudieron efectuar análisis más detallados en cuanto a los tiempos de aparición de proteínas de reserva en el embrión somático así como del efecto de extractos adicionados al medio.

Para la realización del gradiente de sacarosa se prepararon soluciones al 30, 50 y 70 % p/v de sacarosa en agua destilada. A continuación se adicionaron a un tubo para centrifuga de fondo redondo de 50 ml de capacidad, 10 ml de la solución al 70 % seguidos de 10 ml de solución al 50 % y por último 10 ml de solución al 30%

Se tuvo cuidado de adicionar lentamente cada una de las soluciones para permitir que se formara el gradiente e impedir que se rompiera la interfase entre cada una de las diferentes concentraciones.

Enseguida se agregaron los embriones somáticos ya separados del callo ó el callo según fuera el caso. Se procedió a centrifugar a 5000Xg durante 20 minutos a 10 °C y sin freno en la centrifuga, para evitar que un frenado brusco rompiera el gradiente.

Una vez obtenida la separación se procedió a numerar en orden descendente las fracciones obtenidas (figura 4). Se recuperaron las fracciones por succión y se lavaron para eliminar los restos de solución de sacarosa que acompañaban a cada fracción. Se pesó cada fracción obtenida y se efectuó una extracción de albúminas y una de globulinas como se describió anteriormente y se procedió a la separación de las proteínas por electroforesis.

Es necesario precisar que, en los tratamientos con extractos de semillas con diferente grado de madurez, se procedió a conjuntar los embriones existentes en 5 frascos (por tratamiento) y posteriormente se realizó el gradiente y el resto de las etapas subsiguientes.

TECNICA DE ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA - SDS

La técnica de electroforesis es una herramienta muy útil para determinar el número de polipéptidos presentes en una muestra de proteínas así como el peso aproximado de las mismas. Debido a esto se empleó dicha técnica para estimar los cambios en la concentración relativa de proteínas de reserva en los embriones somáticos. Además permitió establecer las diferencias existentes entre embriones cigóticos con diferentes grados de madurez y entre los embriones somáticos y cigóticos.

La técnica empleada fue la descrita por Laemmli (1970). Se utilizó una cámara (82 x 74 mm) doble de electroforesis vertical, para geles con un espesor de 1.5 mm. Las soluciones utilizadas para la electroforesis se enlistan en el apéndice 3.

EXPERIMENTO PARA LA OBTENCION DE EMBRIONES CIGOTICOS CON DIFERENTES GRADOS DE MADUREZ

Para la obtención de semillas con diferente grado de madurez se procedió a marcar plantas de *M. sativa*, var. Puebla 76, que presentaban la inflorescencia a punto de abrir. Las plantas fueron elegidas aleatoriamente y marcadas con un color. Se utilizaron cuatro colores que indicaban una fecha diferente de colecta. Las vainas con las semillas fueron colectadas en los días 15, 30, 45 y 60 después de la apertura de la flor. El día de apertura de la flor fue considerado como el día 0.

Una vez efectuada cada una de las colectas se procedió a sacar las semillas de las vainas y se efectuó la extracción y cuantificación de proteínas (Albúminas y Globulinas) como se indica en las técnicas de extracción y cuantificación de proteínas.

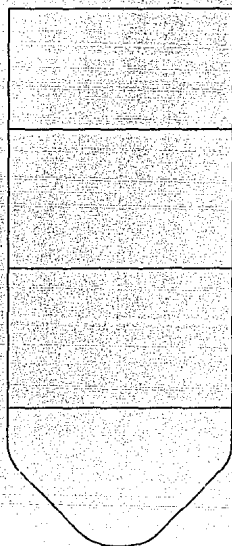
CONCENTRACION
DE
SACAROSA

FRACCION
NUMERO

30 %

50 %

70 %



1

2

3

FIGURA 4.- UBICACION Y NUMERACION DE LAS
DIFERENTES FRACCIONES DE EMBRIONES
SOMATICOS O CALLOS OBTENIDAS POR SEPARACION
EN UN GRADIENTE DISCONTINUO DE SACAROSA

EXPERIMENTO PARA EL ESTUDIO DEL EFECTO DE LA INCORPORACION DE EXTRACTOS AL MEDIO DE CULTIVO. (Diagrama 4)

Una vez obtenidos los extractos de las semillas con diferente grado de madurez, se cuantificó su concentración de proteínas por el metodo de Bradford (1976).

Se prepararon dos lotes de medio de cultivo para la fase de inducción. Uno de ellos fue semejante al mencionado anteriormente; mientras que, el segundo lote fue suplementado con extracto de albúminas de semilla de 15 días de madurez. Este segundo medio fué empleado en los tratamientos 3 y 4 .

Del medio empleado en la fase de desarrollo se prepararon cuatro lotes. El primer lote fue suplementado con extracto de albúminas de semillas de 15 días de madurez; el segundo lote se suplementó con extracto de albúminas de semilla de 30 días de madurez y el tercero con extracto de albúminas de semillas de 45 días de madurez. El cuarto lote fué preparado sin ser suplementado con ningún extracto. La cantidad de extracto

adicionado a los lotes de medio fué la necesaria para obtener una concentración final de 2 gramos de prot./litro de medio (Cibrián, 1991). Los extractos fueron adicionados al medio antes de ajustar el pH. Una vez preparados los medios se mantuvieron en oscuridad.

Se diseñó un experimento constituido por 14 tratamientos. Dos de estos tratamientos se utilizaron como controles y 12 tratamientos se emplearon para conocer el efecto de la adición de los extractos a los medios de cultivo sobre el contenido de proteínas de reserva en los embriones somáticos. En el diagrama 4 se esquematizan los diferentes tratamientos que integran el experimento así como los extractos empleados y los días durante los cuales fueron aplicados.

A continuación se describe cada uno de los tratamientos. El código empleado es el siguiente:

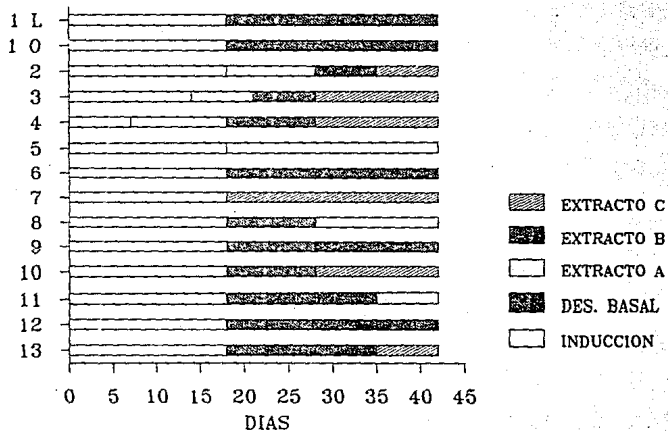
	FASES : [<u>INDUCCION</u> <u>DESARROLLO</u>]
[= DIA 0 DE CULTIVO
	= DIA 18 DE CULTIVO
]	= DIA 42 DE CULTIVO
[= INDUCCION EN MEDIO NORMAL
	= DESARROLLO EN MEDIO NORMAL
●●●●●	= DESARROLLO EN MEDIO SUPLEMENTADO
	CON EXTRACTO DE SEMILLA DE 15 DIAS DE MADUREZ
XXXXXXXXXX	= DESARROLLO EN MEDIO SUPLEMENTADO
	CON EXTRACTO DE SEMILLA DE 30 DIAS DE MADUREZ
	= DESARROLLO EN MEDIO SUPLEMENTADO
	CON EXTRACTO DE SEMILLA DE 45 DIAS DE MADUREZ

TRATAMIENTO 1 L : [| | | | |]

Este tratamiento constituye el tratamiento control en condiciones de fotoperíodo. Los fragmentos de pecíolo fueron sembrados en medio de inducción y permanecieron cultivados en él hasta el día 18. En el día 18 se transplantaron los callos obtenidos a medio de desarrollo. Los callos se mantuvieron en este medio hasta el día 42. En este día se cuantificaron los embriones

DIAGRAMA 4.- DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DEL EFECTO DE LA INCORPORACION DE EXTRACTOS AL MEDIO DE CULTIVO.

TRATAMIENTO



Extractos : A= de semilla de 15 días;
 B= de semilla de 30 días; C= de semilla
 de 45 días.

obtenidos. En todos los tratamientos el 50% del total de embriones somáticos obtenidos se utilizó para estudios bioquímicos (extracción y cuantificación de proteínas y determinación del patrón electroforético) y el 50% restante se utilizó para determinar el porcentaje de conversión.

TRATAMIENTO 1-0 : [_____ ///////////]

Este tratamiento fue el control experimental, ya que la fase de inducción fue desarrollada en condiciones de fotoperíodo, en tanto que la fase de desarrollo fué en condiciones de oscuridad total. Esto se realizó para tener un patrón de comparación bajo condiciones similares ya que en los tratamientos en los cuales se utilizaron medios suplementados con extractos de semillas la fase de desarrollo se llevó a cabo en condiciones de oscuridad. La decisión de efectuar la fase de desarrollo en oscuridad se basó en la posibilidad de que existieran factores fotosensibles en los extractos de semillas. De ser así, los factores se inactivarían al ser expuestos a las condiciones de fotoperíodo y no se detectaría efecto alguno sobre el cultivo.

Así, en este tratamiento, los pecíolos fueron sembrados en medio de inducción y cultivados en él hasta el día 18 en el cual se transplantaron a medio de desarrollo. Durante toda la fase de desarrollo los callos permanecieron en oscuridad total.

TRATAMIENTO 2 : [_____ /••••xxx//]

En este tratamiento se emplearon, en la fase de desarrollo, los tres diferentes extractos a probar. Del día 0 al 18 los pecíolos fueron cultivados en medio de inducción y en condiciones de fotoperíodo. Del día 18 al 28 los callos fueron cultivados en medio de desarrollo suplementado con extracto de semillas de 15 días de madurez y en condiciones de oscuridad. Al día 28 los callos fueron transplantados a medio de desarrollo suplementado con extracto de semillas de 30 días de madurez. Por último, el día 35, los callos se transplantaron a medio de desarrollo suplementado con extracto de semillas de 45 días de madurez.

TRATAMIENTO 3 : [_____ /••!•XXXX//]

En este tratamiento se probaron de nuevo los tres extractos pero variando el momento y tiempo de aplicación. Los pecíolos fueron sembrados en medio de inducción y permanecieron en él hasta el día 14. Este día fueron transplantados a medio de inducción pero suplementado con extracto de semillas de 15 días de madurez. El día 18 los callos fueron transplantados a medio de desarrollo suplementado con extracto de semillas de 15 días de madurez. El día 21 los callos fueron transplantados de nuevo, esta vez a medio de desarrollo suplementado con extracto de semillas de 30 días de madurez. Por último el día 28 los callos se transplantaron a medio de desarrollo suplementado con extracto de semilla de 45 días de madurez. El cultivo se desarrolló en condiciones de fotoperíodo del día 0 al 14 y en condiciones de oscuridad total del día 14 al 42.

TRATAMIENTO 4 : [.....|XXXXX|/////]

Este fué el último tratamiento en el cual se utilizaron los tres extractos. Los pecíolos se sembraron en medio de inducción y se cultivaron del día 0 al 7. El día 7 se transplantaron al medio de inducción suplementado con extracto de semillas de 15 días de madurez. A partir de este día el cultivo se efectuó en condiciones de oscuridad. El día 18 se transplantaron los callos a medio de desarrollo suplementado con extracto de semillas de 30 días de madurez. El día 28 se efectuó el último trasplante de los callos, esta vez a medio de desarrollo suplementado con extracto de semillas de 45 días de madurez.

TRATAMIENTO 5 : [.....|.....|.....]

A partir de este tratamiento los extractos fueron probados de manera independiente.

Los pecíolos fueron sembrados en medio de inducción y cultivados en él hasta el día 18 en condiciones de fotoperíodo. El día 18 los callos fueron transplantados a medio de desarrollo suplementado con extracto de semillas de 15 días de madurez y cultivados hasta el día 42 en oscuridad.

TRATAMIENTO 6 : [.....|XXXXXXXXXXXX]

Los pecíolos se cultivaron del día 0 al 18 en medio de inducción y condiciones de fotoperíodo. El día 18 se transplantaron a medio de desarrollo suplementado con extracto de semillas de 30 días de madurez.

TRATAMIENTO 7 : [.....|/////]

Los pecíolos se sembraron en medio de inducción y se cultivaron hasta el día 18 en fotoperíodo. Del día 18 al 42 los callos se cultivaron en medio de desarrollo suplementado con extracto de semillas de 45 días de madurez y en oscuridad.

TRATAMIENTO 8 : [.....|\\\\\\\\|.....]

Los pecíolos fueron sembrados en medio de inducción y cultivados en él hasta el día 18 en condiciones de fotoperíodo. El día 18 se transplantaron a medio de desarrollo basal (sin ser suplementado con ningún extracto) y se cultivaron en él hasta el día 28. Del día 28 al 42 los callos fueron cultivados en medio de desarrollo suplementado con extracto de semillas de 15 días de madurez. Toda la fase de desarrollo se realizó en oscuridad.

TRATAMIENTO 9 : [.....|\\\\\\\\|XXXXXXX]

Del día 0 al 18 los pecíolos fueron cultivados en medio de inducción. Del día 18 al 28 los callos se cultivaron en medio de desarrollo basal. El día 28 los callos se transplantaron a medio de desarrollo suplementado con extracto de semilla de 30 días de madurez.

TRATAMIENTO 10 : [.....|/////]

Los pecíolos fueron sembrados y cultivados, del día 0 al 18, en medio de inducción y condiciones de fotoperíodo. El día 18 se

transplantaron a medio de desarrollo basal. El día 28 fueron transplantados a medio de desarrollo suplementado con extracto de semillas de 45 días de madurez.

TRATAMIENTO 11 : [_____ ///////////●●●●]

Los pecíolos fueron sembrados en medio de inducción. El día 18 fueron transplantados a medio de desarrollo basal. El día 35 se transplantaron a medio de desarrollo suplementado con extracto de semillas de 15 días de madurez.

TRATAMIENTO 12 : [_____ ///////////XXXX]

Durante los primeros 18 días de cultivo los pecíolos estuvieron en medio de inducción y condiciones de fotoperíodo. Del día 18 al 35 los callos se cultivaron en oscuridad en medio de desarrollo basal. El día 35 los callos se transplantaron a medio de desarrollo suplementado con extracto de semillas de 30 días de madurez.

TRATAMIENTO 13 : [_____ //////////////]

Este tratamiento consistió en cultivar los primeros 18 días los pecíolos en medio de inducción; del día 18 al 35 en medio de desarrollo basal y del día 35 al 42 en medio de desarrollo suplementado con extracto de semillas de 45 días de madurez.

PARAMETROS EVALUADOS EN CADA UNO DE LOS TRATAMIENTOS.

En cada uno de los tratamientos se procedió a evaluar los siguientes parámetros:

- RESPUESTA = # de callos con embriones/# de callos totales;
- RENDIMIENTO = # de embriones totales/# de callos con embriones;
- EFICIENCIA = Respuesta x Rendimiento;
- PESO DE CALLO = peso fresco del callo separado de embriones;
- Estimación visual del contenido de proteínas de reserva en cada tratamiento (de acuerdo a los geles);
- Concentración de albúminas para cada fracción de embriones obtenida y para el callo;
- Concentración de globulinas para cada fracción de embriones obtenida y para el callo;
- Relaciones de las concentraciones de alb/glob;
- % de conversión (germinación) de los embriones somáticos.

RESULTADOS Y DISCUSION

La obtención de embriones somáticos por el método empleado permitió analizar los resultados de los experimentos de manera confiable.

Los fragmentos de pecíolo fueron sembrados en medio de inducción (B₅ modificado por Villegas, 1991, suplementado con 1mg/litro de 2,4-D y 0.2 mg/litro de kin). Se mantuvieron en este medio hasta el día 18. En este tiempo se observó la generación de callo, así como la aparición de los primeros embriones. La formación de callo se inició con un hinchamiento del tejido. Posteriormente se dio la formación de callo de tipo friable con una coloración verde pálido. Es importante notar que el callo no presentó un gran desarrollo. Esto coincide con el hecho de que los callos embriogénicos se desarrollan poco (Villegas, 1991). La aparición de los primeros embriones se detectó, aproximadamente, a partir del día 15 de cultivo. Estos primeros embriones fueron detectados como puntos de color verde intenso lo cual permitió distinguirlos perfectamente del callo.

Durante la fase de desarrollo se observó el desarrollo de los embriones somáticos detectados al final de la etapa de inducción. Además se generaron nuevos embriones, lo cual es una característica de la embriogénesis somática pues anteriormente se ha reportado este sistema como asincrónico (Cibrián, 1991; Rojas, 1991; Villegas, 1991). Los estadios que se observaron durante el desarrollo de los embriones somáticos fueron: globular, de corazón, de torpedo joven y de torpedo maduro o cotiledonar. Esto reafirma la confiabilidad del sistema pues son los estadios reportados por otros autores (Crouch, 1982; Cibrián, 1991; Rojas, 1991; Villegas, 1991; Krochko et al. 1992; Dahmer, et al, 1992). Los porcentajes de respuesta y rendimiento también fueron reproducibles y coincidieron con trabajos realizados anteriormente (Cibrián, 1991; Villegas, 1991).

Lo encontrado en este estudio conjuntamente con los resultados obtenidos en el laboratorio, acaban con el conflicto mencionado por Stuart y cols. (1988) entre la producción de embriones con buena morfología y una alta tasa de conversión. Esto es debido a que los embriones obtenidos en este estudio presentaron, casi en su totalidad, una buena morfología y un alto porcentaje de conversión.

En lo que respecta a la separación de los embriones somáticos en sus diferentes estadios mediante un gradiente discontinuo de sacarosa, esta técnica dio buenos resultados. Las concentraciones de sacarosa empleadas se basaron en un estudio previo realizado por Cibrián (1991). La técnica permitió la obtención de tres fracciones: en la primera, ubicada en la parte superior del gradiente, se localizaron los embriones en estadio de torpedo maduro; en la segunda, ubicada en la interfase entre las concentraciones de 30% y 50% de sacarosa, se encontraron los embriones en estadio de torpedo joven; por último los estadios globular y corazón se ubicaron en la tercer fracción la cual se

localizó en la interfase entre las concentraciones de 50 y 70% (figura 5). El estadio globular es una etapa muy breve en el desarrollo del embrión lo cual aumenta la dificultad de obtenerlo por separado.

La extracción de proteínas se realizó de acuerdo a su solubilidad (Villegas, 1991). La fracción de albúminas fue extraída empleando una solución amortiguadora de fosfatos y la fracción de globulinas con solución amortiguadora de fosfatos adicionada con cloruro de sodio en una concentración 1 molar.

En cada determinación de proteínas se realizaron curvas patrón. Todas las curvas se realizaron por triplicado y las determinaciones de los extractos por duplicado. Las curvas patrón mostraron una gran similitud y un coeficiente de correlación, calculado por mínimos cuadrados, cercano a 1.

La técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida permite la obtención de patrones proteicos. Los cambios en el contenido de proteínas pueden detectarse por variaciones en la intensidad de las bandas. Basándose en esta característica se estimaron los cambios en el contenido de proteínas de reserva en los diferentes tratamientos probados. Cada gel fué repetido, al menos, dos veces. En todos los casos los resultados fueron reproducibles y no existieron variaciones. Se utilizaron como estándares de referencia las proteínas de reserva 7s y 11s obtenidas de semilla madura de alfalfa.

La obtención de semillas con diferente grado de madurez fué realizada por marcaje y colecta cada 15 días como se describe en materiales y metodo. Una vez colectadas las semillas se pesaron y se procedió a realizar la extracción de proteínas (albúminas y globulinas). Posteriormente se determinó la concentración de proteínas por el metodo de Bradford y se efectuó el corrimiento de los geles.

OBTENCION DE EMBRIONES CIGOTICOS CON DIFERENTES GRADOS DE MADUREZ

Al determinar el contenido de proteínas en las partes florales así como en las semillas con diferente grado de madurez (tabla 1, grafica 1) se encontró lo siguiente:

El contenido de proteínas, tanto de albúminas como de globulinas, presenta variaciones en las diferentes estructuras analizadas (pétalo, columna estaminal, y semillas de 15 días). Esto es debido a las diferencias metabólicas existentes entre las estructuras florales y la semilla en desarrollo. Sin embargo, al analizar los resultados obtenidos de las semillas con diferentes grados de madurez, la concentración de proteínas se reduce en las semillas de 30 días, con respecto a las semillas de 15 días. Lo anterior es debido, posiblemente, a un aumento en el grado de hidratación de la semilla, ya que en este momento aún no se ha iniciado el proceso de deshidratación. En frijol de soya se ha encontrado que del día 15 al 30 de desarrollo de la semilla el peso fresco se cuadruplica, en tanto que del día 30 al 45 sólo aumenta un 50% (Kondo et al., 1986; Lee, 1985).

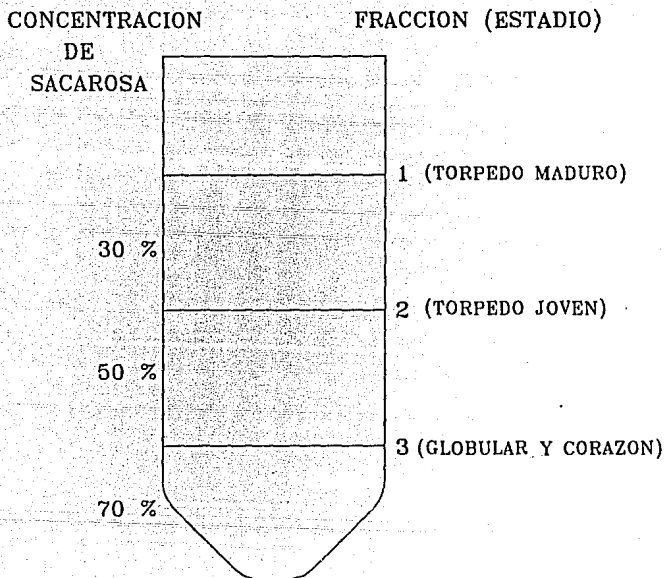


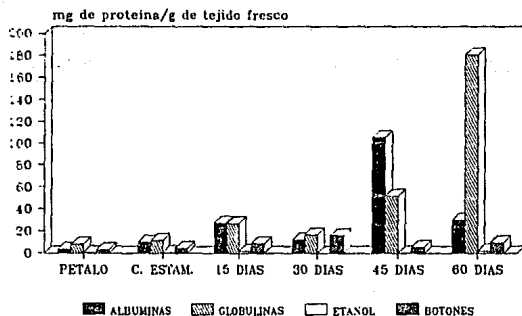
FIGURA 5.- UBICACION, NUMERACION Y ESTADIO DE LAS DIFERENTES FRACCIONES DE EMBRIONES SOMATICOS O CALLOS OBTENIDAS POR SEPARACION EN UN GRADIENTE DISCONTINUO DE SACAROSA

TABLA 1.- CONCENTRACION DE PROTEINAS EXTRAIDAS DE DIFERENTES PARTES FLORALES Y SEMILLAS CON DIVERSOS GRADOS DE MADUREZ

(mg DE PROTEINA/gramo DE TEJIDO FRESCO)

	ALB	GLOB	ET-OH	BOTONES
PETALO	3.54	8.16	0.27	3.2
COLUMNA ESTAMINAL	9.08	11.80	0.45	4.4
15 DIAS	27.10	27.02	1.77	9.0
30 DIAS	12.09	16.96	0.00	16.2
45 DIAS	105.56	51.93	0.42	5.6
60 DIAS	29.77	180.50	2.03	9.6

GRAFICA 1.- CONCENTRACION DE LAS PROTEINAS EXTRAIDAS DE PARTES FLORALES Y DE SEMILLAS CON DIFERENTES GRADOS DE MADUREZ



Al día 45 se observa un aumento considerable en la cantidad de albúminas presentes en las semillas. Una explicación a esto es que en las semillas de 30 días se inicia la síntesis de proteínas de reserva, las cuales se encuentran aún solubles y son extraídas en la fracción de albúminas en el día 45. La proteína 7S es la principal en impartir esta característica ya que es la primer proteína de reserva que es sintetizada (Larkins, 1981; Lee, 1985; Kondo et al., 1986; Cibrián, 1991; Villegas, 1991; Krochko et al., 1992). Las proteínas de reserva se almacenan, posteriormente, en forma insoluble y por lo tanto son extraídas en la fracción de globulinas (figs. 6 y 7). La proteína 11S fue localizada a partir del día 45, tiempo similar al reportado para frijol en el cual se encuentra a esta proteína a partir del día 50 (Lee, 1985).

A los 60 días prácticamente ha terminado la formación de la semilla por lo que todas las proteínas de reserva sintetizadas deben estar en forma insoluble. Esto es debido a que, como la semilla se deseca, las proteínas de reserva no deben ser osmóticamente activas. Además, deben ser estables durante un largo período de tiempo (hasta la germinación) y la estructura de estas proteínas debe ser compatible con las enzimas proteolíticas que se producen o liberan durante la germinación (Larkins, 1983). Esto coincide con la disminución drástica de la concentración de albúminas presentes en la semilla y la enorme concentración de globulinas (tabla 1; Lee, 1985; Villegas, 1991). Estos resultados concuerdan con la acumulación diferencial de albúminas y globulinas durante el desarrollo de la semilla de Pisum sativum (Hill y Breidenbach, 1974).

Esto indica que la maquinaria de síntesis de proteínas de reserva en la semilla se activa y es manifiesta alrededor del día 30, en tanto que el empaquetamiento se detecta a partir del día 45 aunque en este momento aún es bajo. Entre los días 45-60 se dispara el proceso de empaquetamiento de las proteínas de reserva sintetizadas de modo tal que en el día 60 todas las proteínas están en forma insoluble, es decir completamente empaquetadas (Larkins, 1983).

La relación de concentración de alb/glob, así como lo observado en el gel permite establecer los cambios en el grado de solubilidad de las proteínas de reserva conforme avanza el proceso de maduración del embrión cigótico. La relación obtenida a partir de semillas de 15 y de 30 días es cercana a 1 (tabla 1) lo que indica una concentración equitativa de ambos tipos de proteínas. Al día 45 esta relación aumenta a valores mayores de 2 (tabla 1). Esto muestra una mayor cantidad de proteínas que son extraídas en la fracción de albúminas. Sin embargo debe considerarse que, como se observa en el gel (fig 6), la proteína de reserva 7S se detecta a partir de semillas de 30 días en la fracción de albúminas. Esto coincide con lo reportado por otros autores (Larkins, 1981; Lee, 1985; Kondo et al., 1986; Cibrián, 1991; Villegas, 1991; Krochko et al., 1992). Por lo tanto se puede atribuir el aumento en la concentración de albúminas al inicio de la síntesis de proteínas de reserva las cuales aún no se han empaquetado y permanecen solubles.



Figura 6.- Gel de poliacrilamida de los extractos de albúminas de diferentes partes florales y semillas con diferente grado de madurez.

- Carril : 1.- Vacio.
 2.- Pétalo.
 3.- Columna Estaminal.
 4.- Semilla de 15 días.
 5.- Semilla de 30 días.
 6.- Semilla de 45 días.
 7.- Semilla de 60 días.
 8.- 7s.
 9.- 11s.
 10.- Vacio.

Por último, la relación de alb/glob en semillas de 60 días es de 0.16 lo que indica que existen 6 veces más proteínas del tipo de las globulinas que del tipo albúminas. Esto confirma reportes anteriores en los que se menciona a las globulinas como proteínas más abundantes que las albúminas (Lee, 1985; Villegas, 1991). Esto se debe a que la semilla es muy rica en proteínas de reserva las cuales, como ya se mencionó, se empaquetan y son extraídas como globulinas (fig 7). Así, en la semilla de 60 días tenemos a las proteínas de reserva perfectamente empaquetadas e insolubles lo cual les permitiera desempeñar su función de material de reserva para la germinación del embrión cuando sea el momento adecuado.

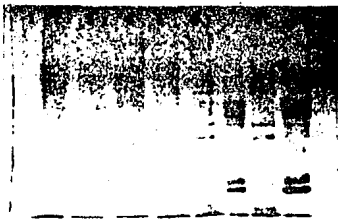


Figura 7.- Gel de poliacrilamida de los extractos de globulinas de diferentes partes florales y semillas con diferente grado de madurez.

- Carril : 1.- Vacio.
 2.- Pétalo.
 3.- Columna Estaminal.
 4.- Semilla de 15 días.
 5.- Semilla de 30 días.
 6.- Semilla de 45 días.
 7.- Semilla de 60 días.
 8.- 7S.
 9.- 11S.
 10.- Vacio.

SEPARACION DE LOS DIFERENTES ESTADIOS DE DESARROLLO DE LOS
 EMBRIONES SOMATICOS POR CENTRIFUGACION EN GRADIENTE DISCONTINUO
 DE SACAROSA

Al realizar el gradiente discontinuo de sacarosa se obtuvieron 3 fracciones de callo y 3 fracciones de embriones (tabla 2). Las fracciones se numeraron en orden descendente de acuerdo con su ubicación en el gradiente (fig 5). Al realizar la cuantificación de proteínas de cada una de las fracciones se encontró que, en las fracciones de CALLO, la fracción 1 es la que posee una mayor concentración de albúminas y globulinas. A esta fracción la sigue la fracción 2 y por último la 3. La relación alb/glob es cercana a 2 en todos los casos (tabla 2 y gráfica 2). En los callos se observa que al realizar una extracción exhaustiva de las proteínas que aún restan en los botones se logra extraer casi un 50% más de proteínas similares a las extraídas como globulinas (tabla 2, gráfica 2, fig 8).

En la fracción 1 de embriones somáticos quedaron comprendidos aquellos embriones en estadio de torpedo maduro o cotiledonar. En la fracción 2 los embriones en etapa de torpedo joven y en la fracción 3 se ubicaron los embriones globulares y en estadio de corazón. Estos resultados coinciden con un trabajo realizado por Cibrián (1991).

Al analizar el desarrollo que siguen los embriones somáticos encontramos el siguiente orden:
 globular → corazón → torpedo joven → torpedo maduro o

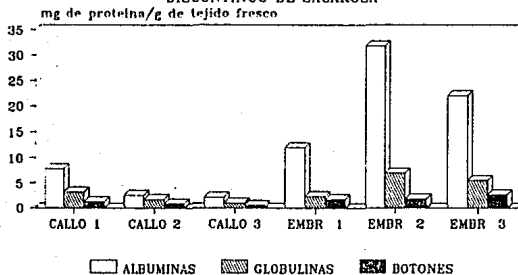
TABLA 2.- CONCENTRACION DE LAS PROTEINAS PRESENTES EN CADA UNA DE LAS FRACCIONES, DE EMBRIONES SOMATICOS Y CALLO, OBTENIDAS POR SEPARACION EN GRADIENTE DISCONTINUO DE SACAROSA

(mg DE PROTEINA/gramo DE TEJIDO FRESCO)

FRACCION	ALBUMINAS	GLOBULINAS	BOTONES	ALB/GLOB
CALLO 1	7.81	3.20	1.28	2.44
CALLO 2	2.58	1.78	0.00	1.48
CALLO 3	2.18	1.00	0.55	2.18
EMB 1	12.01	2.38	1.75	5.04
EMB 2	31.86	7.00	1.83	4.55
EMB 3	22.11	5.47	2.70	4.04

LAS FRACCIONES FUERON NUMERADAS EN ORDEN DESCENDENTE EN EL GRADIENTE. EMB 1 = EMBRIONES EN ESTADIO DE TORPEDO MADURO; EMB 2 = EMBRIONES EN ESTADIO DE TORPEDO JOVEN; EMB 3 = EMBRIONES EN ESTADIOS GLOBULAR Y CORAZON.

GRAFICA 2.- CONCENTRACION DE LAS PROTEINAS PRESENTES EN CADA UNA DE LAS FRACCIONES, DE EMBRIONES SOMATICOS Y CALLO, OBTENIDAS POR SEPARACION EN GRADIENTE DISCONTINUO DE SACAROSA



LAS FRACCIONES FUERON NUMERADAS EN ORDEN DESCENDENTE EN EL GRADIENTE. EMB 1 = EMBRIONES EN ESTADIO DE TORPEDO MADURO; EMB 2 = EMBRIONES EN ESTADIO DE TORPEDO JOVEN; EMB 3 = EMBRIONES EN ESTADIOS GLOBULAR Y CORAZON

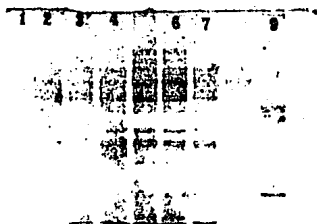


Figura 8.- Gel de extractos de albúminas de las diferentes fracciones de callo y embriones somático obtenidos por separación en gradiente discontinuo de sacarosa.

Carril : 1 y 10.- Vacíos.

- 2.- Callo fracción 1.
- 3.- Callo fracción 2.
- 4.- Callo fracción 3.
- 5.- Embrión fracción 1 (globular y corazón).
- 6.- Embrión fracción 2 (torpedo joven).
- 7.- Embrión fracción 3 (torpedo maduro o cotiledonar).
- 8.- 7S.
- 9.- 11S.

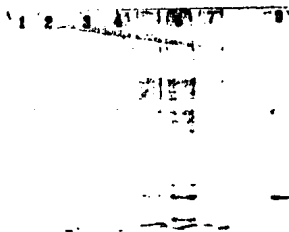


Figura 9.- Gel de extractos de globulinas de las diferentes fracciones de callo y embriones somáticos obtenidos por separación en gradiente discontinuo de sacarosa.

Carril : 1 y 10.- Vacíos.

- 2.- Callo fracción 1.
- 3.- Callo fracción 2.
- 4.- Callo fracción 3.
- 5.- Embrión fracción 1 (globular y corazón).
- 6.- Embrión fracción 2 (torpedo joven).
- 7.- Embrión fracción 3 (torpedo maduro o cotiledonar).
- 8.- 7S.
- 9.- 11S.

cotiledonar.

Esta ruta de desarrollo coincide con la reportada por otros autores y la encontrada en el laboratorio (Crouch, 1982; Cibrián, 1991; Rojas, 1991; Villegas, 1991; Krochko et al., 1992; Dahmer, et al., 1992).

La fracción de embriones somáticos que mostró una mayor concentración de proteínas fué la 2 seguida de la 3 y por último la fracción 1 (tabla 2, gráfica 2). En estas fracciones la relación alb/glob oscila entre 4 y 5.

Al establecer una comparación entre la ruta de desarrollo y la concentración de proteínas, podemos ver que el estadio globular posee una concentración relativamente alta de proteínas. Sin embargo poco o nada de estas proteínas corresponde a proteínas de reserva (fig. 9). Al avanzar el desarrollo (fracción 2) el contenido de proteínas aumenta y ya son distinguibles las proteínas de reserva (fig. 9). Al analizar la fracción 1 se observa un desplome en la concentración de proteínas de más del 250% (esto al dividir la concentración de proteínas de la fracción 2 entre la de la fracción 3). Esto coincide con lo reportado por Cibrián (1991) al trabajar con este mismo sistema de embriogénesis somática en alfalfa. Lo anterior es debido a que las proteínas de reserva no se están acumulando, pero el tamaño y peso del embrión continúan aumentando.

La falta de acumulación de proteínas de reserva puede ser debida a que se estén empleando en los procesos de desarrollo de la planta ya que las condiciones en las que se encuentra cultivado son propicias para ello. Una de tales condiciones es la alta humedad relativa la cual puede activar enzimas encargadas de degradar el material de reserva para que esté disponible para la germinación (Croissant-Sych y Bopp, 1988; Villegas, 1991). Como ejemplos de estas enzimas se tienen a la malato sintasa y la isocitrato liasa (Bewley y Black, 1982; Finkelstein y Crouch, 1987).

Existe otra posible explicación para la falta de material de reserva en los embriones somáticos. Krochko et al. (1992) publicaron un estudio sobre el contenido de mRNA de proteínas de reserva en embriones somáticos de alfalfa, encontrando niveles reducidos al compararlos con los determinados en semillas.

Otra explicación para este fenómeno es que las proteínas de reserva sintetizadas en el embrión somático sean degradadas antes de ser empaquetadas. Esto puede darse en el momento posterior a la síntesis y durante el transporte de las proteínas. Una señal para la degradación ha sido detectada en sistemas animales y consiste en un mal ensamble de los péptidos que constituyen a la proteína de tal modo que sitios específicos quedan expuestos y funcionan como señal para la degradación de dichas proteínas (Bonifacino et al., 1990). Si consideramos que las proteínas de reserva son hexámeros y que aún se desconoce mucho sobre su transporte, acoplamiento y empaquetamiento esta posibilidad no puede ser descartada.

EFFECTO DE LA INCORPORACION DE EXTRACTOS AL MEDIO DE CULTIVO

Al utilizar extractos de semillas de diferentes grados de madurez y para poder definir su efecto se procedió a tener dos controles. El primer control (denominado como tratamiento 1 luz y abreviado como 1 L) consistió en desarrollar el proceso de embriogénesis somática en las condiciones ya establecidas de antemano en el laboratorio. El segundo control (denominado tratamiento 1 oscuridad y abreviado como 1-0) consistió en desarrollar el procedimiento ya estandarizado pero con la modalidad de llevar a cabo la fase de desarrollo en oscuridad (diagrama 4). Esta característica se eligió ya que al emplear los extractos cabía la posibilidad de que existieran factores fotosensibles en el extracto.

Para los fines antes mencionados se procedió a evaluar, en cada tratamiento, los siguientes parámetros:

- Fraciones obtenidas por gradiente discontinuo de sacarosa;
- 3 de Respuesta;
- Rendimiento;
- Eficiencia;
- Peso del callo;
- Estimación visual del contenido de proteínas de reserva;
- Concentración de albúminas y globulinas;
- Germinación o conversión.

Es importante hacer la aclaración de que al efectuar esta fase experimental se produjo una elevación considerable de la temperatura en el cuarto de incubación lo cual afectó el desarrollo de los embriones de tal modo que la separación por gradiente discontinuo de sacarosa dio solamente las fracciones 2 y 3 en el tratamiento 1 L (control normal). Este efecto es debido a que el proceso de embriogénesis in-vitro es sensible a los cambios de temperatura (Villegas, 1991).

En la tabla 5 (pag. 46) se observa que, al realizar la fase de desarrollo de la embriogénesis somática en oscuridad o con los extractos de semillas, se produce una "sincronía" del desarrollo de los embriones somáticos en la fase de torpedo joven (fracción 2 del gradiente de sacarosa). Solamente en los tratamientos 10 y 13 se presentaron embriones en estado cotiledonar (fracción 1). Esto nos indica que existe uno o varios factores en el extracto de semillas de 45 días de madurez que permiten eliminar o atenuar el efecto de la elevación de temperatura sobre el desarrollo de los embriones somáticos. También nos indica que este efecto depende del momento en el cual se encuentre el cultivo ya que en el tratamiento 7, en el que se empleó este mismo extracto pero a partir del día 18, no se obtuvo la fracción 1 en el gradiente.

A continuación se describen los resultados obtenidos en los diferentes parámetros evaluados en cada tratamiento. para ello se emplea la simbología siguiente:

FASES : [INDUCCION | DESARROLLO]
 [= DIA 0 DE CULTIVO
 | = DIA 18 DE CULTIVO

]	= DIA 42 DE CULTIVO
[= INDUCCION EN MEDIO NORMAL
	= DESARROLLO EN MEDIO NORMAL
.....	= DESARROLLO EN MEDIO SUPLEMENTADO CON
	EXTRACTO DE SEMILLA DE 15 DIAS DE MADUREZ
[XXXXXXXXXX]	= DESARROLLO EN MEDIO SUPLEMENTADO CON
	EXTRACTO DE SEMILLA DE 30 DIAS DE MADUREZ
	= DESARROLLO EN MEDIO SUPLEMENTADO CON
	EXTRACTO DE SEMILLAS DE 45 DIAS DE MADUREZ

TRATAMIENTO 1L : [_____] |||

El tratamiento 1 en fotoperíodo (1 L) es el que mostró mayor porcentaje de respuesta, mayor rendimiento y eficiencia (tablas 3 y 4, graficas 3, 4 y 5). En lo que respecta al peso del callo se encuentra en una posición intermedia (tablas 3 y 4, graficas 3, 4 y 5).

TRATAMIENTO 1-0 : [_____] |||

El cambio a condiciones de oscuridad durante la fase de desarrollo (tratamiento 1-0) afectó respuesta, rendimiento eficiencia y peso del callo con respecto a el control en luz (tablas 3 y 4, graficas 3, 4 y 5) lo cual confirma que estos parametros son alterados por las condiciones de cultivo (Villegas, 1991). Este mecanismo es muy probable que este relacionado con la capacidad fotosintetica del tejido ya que al estar en oscuridad los embriones pierden el color verde que es característico de ellos en el protocolo de embriogénesis normal (1 L).

TRATAMIENTO 2 : [_____] |.....XXX|

El tratamiento numero 2 ocupó el lugar 11 en lo que respecta a respuesta, en tanto que el rendimiento fué de 7 embriones por callo y la eficiencia calculada lo ubicó en el lugar #12. Este tratamiento mostró un peso de callo de 0.45 gr (tablas 3 y 4, graficas 3, 4 y 5). Esto concuerda con las observaciones que permiten establecer una relación inversa entre la respuesta y el peso del callo (Villegas, 1991).

TRATAMIENTO 3 : [_____] |..|XXXX|

El tratamiento 3 fué el lugar 10 en repuesta y el lugar 13 en rendimiento y eficiencia. En lo que respecta al peso del callo ocupó la sexta posición (tablas 3 y 4, graficas 3, 4 y 5).

TRATAMIENTO 4 : [_____] |.....|XXXX|

El tratamiento #4 fué el más afectado en los parametros evaluados ya que ocupó la posición 13 en respuesta y peso de callo y la 14 en rendimiento y eficiencia (tablas 3 y 4, graficas 3, 4 y 5). En este tratamiento aún cuando el peso del callo fué muy bajo la respuesta y el rendimiento también fueron bajos debido a que los extractos adicionales fueron empleados desde la fase de inducción y esto afectó de manera negativa los parametros

TABLA 3.- EFECTO DE LA ADICION DE EXTRACTOS SOBRE LOS
DIFERENTES PARAMETROS EVALUADOS

TRAT.	% RESP.	REND.	EFIC.	P. CALLO	7 S	11 S
1 L	94.40	27	2.55	0.32	+++	+++
1-0	77.70	11	0.05	0.23	+++	+++
2	78.94	7	0.55	0.45	+++	+++
3	79.31	6	0.47	0.33	+	+
4	75.00	5	0.37	0.11	+++	+++
5	85.00	7	0.59	0.17	++	-
6	89.50	27	2.41	0.20	+	+
7	85.70	11	0.94	0.06	+++	-
8	75.00	14	1.05	0.37	++++	+++
9	86.00	13	1.12	0.12	+++	+
10	90.90	9	0.81	0.41	+++	++++
11	80.90	12	0.97	0.42	++	+
12	90.00	16	1.44	0.26	+++	++
13	81.10	9	0.73	0.38	+++	+++

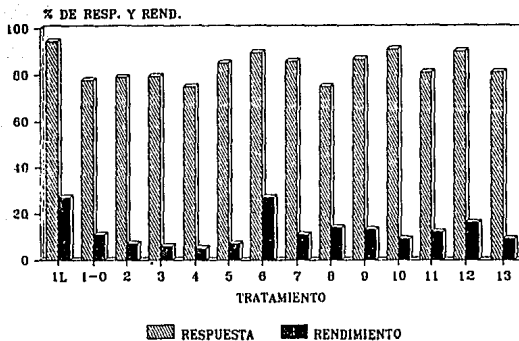
% RESP. = PORCENTAJE DE RESPUESTA; REND. = RENDIMIENTO
EFIC. = EFICIENCIA; P. CALLO = PESO DEL CALLO
7S Y 11S = PROTEINAS DE RESERVA

TABLA 4.- ORDENAMIENTO, EN FORMA DECRECIENTE, DE LOS
EFECTOS OBTENIDOS AL ADICIONAR EXTRACTOS DE SEMILLAS
AL MEDIO DE CULTIVO

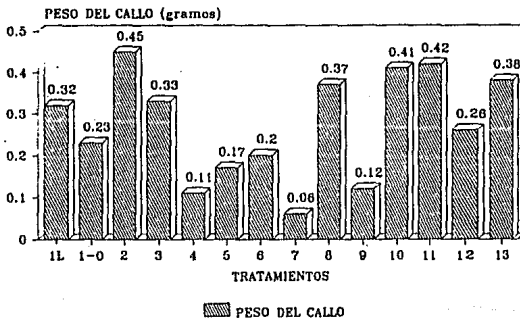
LUGAR	% DE RESP.	REND.	EFIC.	P. CALLO
1	1L	1L	1L	2
2	10	6	6	11
3	12	12	12	10
4	6	8	9	13
5	9	9	8	8
6	7	11	11	3
7	5	1-0	7	1L
8	13	7	1-0	12
9	11	10	10	1-0
10	3	13	13	6
11	2	2	5	5
12	1-0	5	2	9
13	4	3	3	4
14	8	4	4	7

% DE RESP. = PORCENTAJE DE RESPUESTA REND. = RENDIMIENTO EFIC. = EFICIENCIA
P. CALLO = PESO DEL CALLO

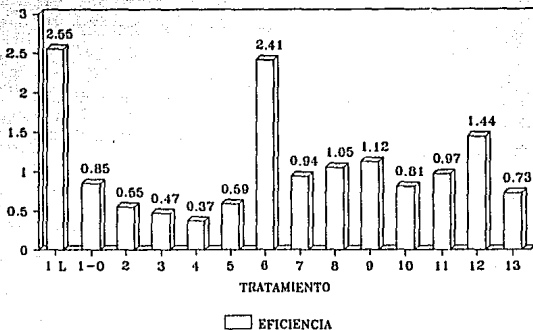
GRAFICA 3.- EFECTO DE LA ADICION DE EXTRACTOS
SOBRE EL PORCENTAJE DE RESPUESTA Y RENDIMIENTO



GRAFICA 4.- EFECTO DE LA ADICION DE EXTRACTOS
SOBRE EL PESO DEL CALLO



GRAFICA 5.- EFECTO DE LA ADICION DE EXTRACTOS
SOBRE LA EFICIENCIA



evaluados ya que el proceso de embriogénesis somática apenas esta iniciando. Además el adicionar extractos en la fase de inducción implicó realizar el cultivo en oscuridad y esto modifica negativamente los parametros evaluados (Villegas, 1991).

TRATAMIENTO 5 : [.....]

El septimo sitio en el porcentaje de respuesta fué para el tratamiento 5. Este tratamiento ocupó los lugares 12, 10 y 10 en rendimiento, eficiencia y peso del callo respectivamente (tablas 3 y 4, graficas 3, 4 y 5).

TRATAMIENTO 6 : [XXXXXXXXXXXXX]

El tratamiento marcado con el numero 6 ocupó el cuarto lugar en respuesta, el segundo en rendimiento y eficiencia y el 10 en peso del callo (tablas 3 y 4, graficas 3, 4 y 5). Este tratamiento llama particularmente la atención pues muestra una respuesta del 84.5% y un rendimiento de 27 embriones por callo.

Esta respuesta es similar a la que presenta el control en luz (1 L) y mayor que la presentada por el control en oscuridad (1-0). El rendimiento de este tratamiento es igual al de el control en luz y mayor del que presenta el control en oscuridad. Como consecuencia de los resultados anteriores la eficiencia es la mayor de todos los tratamientos cuya fase de desarrollo se llevó a cabo

en condiciones de oscuridad y solo ligeramente menor que la presentada por el tratamiento control en condiciones normales (1 L). Esto hace pensar que en el extracto de semillas con 30 días de madurez existe un factor que neutraliza parcial o totalmente el efecto de la oscuridad sobre la respuesta y el rendimiento de los callos de peciolo de alfalfa. Este factor no tiene efecto sobre un desarrollo posterior de los embriones somáticos ya que no se presentó la fracción 1 (embriones cotiledonares) en el gradiente de sacarosa de este tratamiento.

El bajo peso del callo obtenido en este tratamiento confirma la relación inversa existente entre el desarrollo del callo y la respuesta, anteriormente mencionada.

TRATAMIENTO 7 : [_____ |//////////]

El tratamiento 7 ocupó el sexto lugar en respuesta, el octavo en rendimiento y el séptimo en eficiencia. Así mismo fué el que presentó el menor peso del callo ocupando la posición #14 (tablas 3 y 4, graficas 3, 4 y 5).

TRATAMIENTO 8 : [_____ |////////●●●●●●]

El tratamiento 8 fué afectado severamente en lo que respecta a respuesta ya que ocupó el último lugar. Sin embargo en los otros tres parametros nos se mostró tan afectado (comparado con los controles) pues ocupó los lugares 4, 5 y 5 en rendimiento, eficiencia y peso del callo respectivamente. Estos últimos tres factores superan el tratamiento control en oscuridad (tablas 3 y 4, graficas 3, 4 y 5).

TRATAMIENTO 9 : [_____ |////////XXXXXXX]

El tratamiento numero 9 ocupó el quinto lugar en respuesta y rendimiento, el cuarto en eficiencia y el doceavo en peso del callo (tablas 3 y 4, graficas 3, 4 y 5). En este tratamiento se empleo de nuevo el extracto de semillas de 30 días de madurez. Como se puede apreciar en la tabla 4 este tratamiento muestra un comportamiento de los más uniformes y con parametros estimados de los más altos con respecto al resto de los tratamientos, superando incluso al control en oscuridad.

TRATAMIENTO 10 : [_____ |//////////]

El tratamiento 10 arrojó resultados interesantes ya que muestra el porcentaje de respuesta más alto de todos los tratamientos colocados en oscuridad durante la fase de desarrollo del proceso de embriogénesis. La respuesta de este tratamiento solo es superada en un 3.5% por el control en luz y es 13.2% mayor que la obtenida en el tratamiento 1-0. Sin embargo el rendimiento de este tratamiento fué bajo (9 embriones por callo) lo cual lo ubica en el sitio 9 y con ello la eficiencia de el tratamiento ocupa también el noveno sitio. El peso del callo de este tratamiento fué de los más bajos por lo cual lo encontramos en el lugar 12 (tablas 3 y 4, graficas 3, 4 y 5).

Los últimos tres tratamientos, los cuales recibieron el tratamiento con extractos durante la última semana (diagrama 4)

TABLA 5.- EFECTO DE LA ADICION DE EXTRACTOS SOBRE
LA CONCENTRACION DE ALBUMINAS
(UNIDADES : mg DE PROTEINA/gramo DE TEJIDO FRESCO)

TRATAMIENTO	CALLO	EMBRION 1	EMBRION 2	EMBRION 3
1 L	0.852	0	12.369	15.142
1-0	1.681	0	21.632	0
2	0.676	0	5.387	0
3	1.137	0	6.758	0
4	1.565	0	19.13	0
5	0.914	0	12.130	0
6	2.813	0	10.23	0
7	5.602	0	6.977	0
8	1.444	0	16.400	0
9	2.284	0	24.843	0
10	3.271	9.637	17.856	0
11	1.243	0	11.742	0
12	0.191	0	10.772	0
13	1.841	6.588	33.784	0

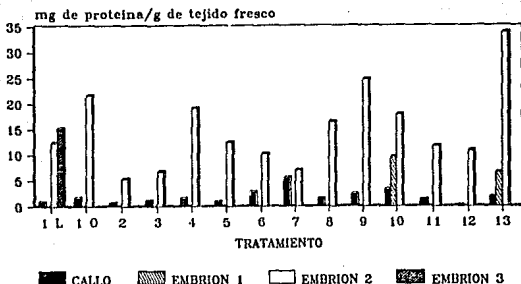
LAS FRACCIONES SE OBTUVIERON POR SEPARACION EN
GRADIENTE DISCONTINUO DE SACAROSA

EMB 1 = EMBRIONES EN ESTADIO DE TORPEDO MADURO

EMB 2 = EMBRIONES EN ESTADIO DE TORPEDO JOVEN

EMB 3 = EMBRIONES EN ESTADIOS GLOBULAR Y DE CORAZON.

GRAFICA 6.- EFECTO DE LA ADICION DE EXTRACTOS
SOBRE LA CONCENTRACION DE ALBUMINAS



LAS FRACCIONES FUERON OBTENIDAS POR SEPARACION EN GRADIENTE DISCONTINUO DE SACAROSA

EMB 1 = EMBRIONES EN ESTADIO DE TORPEDO MADURO.

EMB 2 = EMBRIONES EN ESTADIO DE TORPEDO JOVEN.

EMB 3 = EMBRIONES EN ESTADIOS GLOBULAR Y CORAZON.

somáticos se vio que en la fracción 1 (embriones en estadio de torpedo maduro), obtenida por gradiente de sacarosa sólo en los tratamientos 10 y 13 (tabla 5, grafica 6), el tratamiento 10 presentó la mayor concentración.

La fracción 2 (embriones en estadio de torpedo joven), obtenida en todos los tratamientos, presentó también un aumento en la concentración de albúminas con el solo hecho de realizar el cultivo de la fase de desarrollo en oscuridad (tablas 5 y 6, grafica 6).

Al comparar los tratamientos contra el control en fotoperiodo (1 L) se encontró que los tratamientos 1-0, 4, 5, 8, 9, 10 y 13 contenían mayor concentración de albúminas. De estos tratamientos el 5 y 8 fueron sometidos al efecto de extractos de 15 días, el 9 a extracto de 30 días y el 10 y 13 a extracto de 45 días (diagrama 4). De esto se desprende que existe una tendencia, no muy clara, de los extractos de 15 y 45 días de inducir una mayor concentración de albúminas en los embriones somáticos. Esta tendencia se ve afectada por el momento de aplicación de los extractos con respecto al desarrollo de los embriones somáticos, pues los tratamientos 7 y 11 emplearon extractos de semillas 45 y 15 días de desarrollo respectivamente y no superaron al tratamiento 1-0.

De los tratamientos arriba discutidos sobresalen el #9 el cual duplica la concentración de albúminas del tratamiento 1 L y el tratamiento 13 que presenta 2.72 veces más albúminas que el

TABLA 6.- CONCENTRACION RELATIVA DE PROTEINAS DE LA FRACCION 2 DE EMBRIONES SOMATICOS DE CADA TRATAMIENTO, CON RESPECTO AL CONTROL

TRAT.	ALB	GLOB	ALB/GLOB	ALB TRAT/CONT	GLOB TRAT/CONT
1L	12.37	4.44	2.78	1	1
1-0	21.63	2.28	9.50	1.75	0.51
2	5.39	0.88	6.10	0.43	0.19
3	6.78	1.17	5.75	0.54	0.26
4	19.13	4.35	4.40	1.54	0.98
5	12.45	2.40	5.18	1.01	0.54
6	10.23	1.43	7.14	0.83	0.32
7	6.97	3.49	2.00	0.56	0.78
8	16.40	6.26	2.61	1.33	1.41
9	24.84	5.77	4.30	2.00	1.29
10	17.85	2.75	6.49	1.45	0.62
11	11.74	1.53	7.67	0.95	0.34
12	10.77	1.28	8.37	0.86	0.28
13	33.78	2.84	11.90	2.77	0.64

LOS DATOS DE LAS DOS ULTIMAS COLUMNAS SE CALCULARON DIVIDIENDO LA CONCENTRACION DETERMINADO EN LA FRACCION 2 DE EMBRIONES SOMATICOS DE CADA TRATAMIENTO ENTRE LA CONCENTRACION DE PROTEINA CORRESPONDIENTE EN LA MISMA FRACCION DE EMBRION 2 DEL TRATAMIENTO CONTROL (1 L)
FRACCION 2 = EMBRIONES EN ESTADIO DE TORPEDO JOVEN

tratamiento 1 L y 1.56 veces más albúminas que el 1-0 (tabla 6).

Los tratamientos 2, 3, 6, 7, 11 y 12 presentan menor concentración de albúminas que el tratamiento 1 L. Sin embargo los tratamientos 6, 11 y 12 no están demasiado lejos de la concentración del control en fotoperíodo (tabla 5).

Así, se observa que los tres tratamientos con extracto de 15 días producen una concentración de albúminas similar o mayor a la observada en el tratamiento 1 L. Cabe hacer notar que los tratamientos a los que se les aplicó extracto de semillas de 30 días y que fueron los que mostraron mayor respuesta, rendimiento y eficiencia muestran un orden inverso en lo que respecta a la concentración de albúminas, con respecto al orden encontrado en los parámetros antes mencionados.

CONCENTRACION DE GLOBULINAS EN CADA UNO DE LOS TRATAMIENTOS

En lo que respecta a las concentraciones de globulinas, éstas se analizaron de manera similar a como se efectuó con las albúminas.

En los callos observamos un aumento en la concentración de globulinas también con el solo hecho de que la fase de desarrollo fuese en oscuridad. Todos los tratamientos superan al 1 L. Los tratamientos 2 y 11 son los únicos que no superaron la concentración de globulinas del tratamiento 1-0. Los tratamientos 7, 9, 10 y 12 son los que mostraron mayor concentración de globulinas (tabla 7, grafica 7).

La fracción 1 de embriones somáticos (torpedo maduro) sólo se obtuvo en los tratamientos 10 y 13. El tratamiento 13 fue el que presentó la mayor concentración de globulinas (tabla 7, grafica 7). Esto nos da una relación inversa con respecto a los resultados obtenidos en la concentración de albúminas y muestra que un mismo extracto tiene efectos diferentes sobre diferente tipo de proteínas y que este efecto dependió del momento en que se aplicó el extracto.

Los tratamientos tuvieron efectos diversos con respecto a la concentración de globulinas en la fracción 2 de embriones somáticos (torpedo joven).

De nuevo los tratamientos 4, 5, 8, 9, 10 y 13 fueron los que mostraron mayor concentración de globulinas (al igual que se observó en albúminas). Sin embargo existe un tratamiento que se une a este grupo y es el #7 el cual mostró una concentración de globulinas que equivale a 1.5 veces la concentración de globulinas del tratamiento 1-0 (tablas 6 y 7, grafica 7).

Cabe hacer notar que se está comparando los tratamientos con el control en oscuridad (1-0) ya que es el tratamiento en el cual el único cambio fue en las condiciones de iluminación. De este modo los cambios que sean detectados serán consecuencia de los extractos adicionados al medio de cultivo.

En las globulinas se extraen, en el embrión cigótico, las

**TABLA 7.- EFECTO DE LA ADICION DE EXTRACTOS
SOBRE LA CONCENTRACION DE GLOBULINAS
(UNIDADES : mg DE PROTEINA/gramo DE TEJIDO FRESCO)**

TRATAMIENTO	CALLO	EMBRION 1	EMBRION 2	EMBRION 3
1 L	0.124	0	4.440	4.049
1-0	0.34	0	2.277	0
2	0.196	0	0.882	0
3	0.361	0	1.175	0
4	0.517	0	4.348	0
5	0.406	0	2.403	0
6	0.529	0	1.432	0
7	1.146	0	3.488	0
8	0.342	0	6.261	0
9	0.888	0	5.767	0
10	0.724	1.368	2.747	0
11	0.295	0	1.529	0
12	0.965	0	1.287	0
13	0.578	2.353	2.838	0

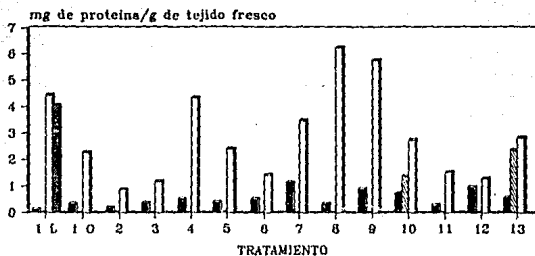
LAS FRACCIONES FUERON OBTENIDAS POR SEPARACION EN GRADIENTE DISCONTINUO DE SACAROSA.

EMB 1 = EMBRIONES EN ESTADIO DE TORPEDO MADURO.

EMB 2 = EMBRIONES EN ESTADIO DE TORPEDO JOVEN.

EMB 3 = EMBRIONES EN ESTADIOS GLOBULAR Y CORAZON.

GRAFICA 7.- EFECTO DE LA ADICION DE EXTRACTOS
SOBRE LA CONCENTRACION DE GLOBULINAS



LAS FRACCIONES FUERON OBTENIDAS POR SEPARACIÓN EN GRADIENTE DISCONTINUO DE SACAROSA.

EMD 1 = EMBRIONES EN ESTADIO DE TORPEDO MADURO.

EMD 2 = EMBRIONES EN ESTADIO DE TORPEDO JOVEN.

EMD 3 = EMBRIONES EN ESTADIOS GLOBULAR Y CORAZON.

proteínas de reserva. En los embriones somáticos las proteínas de reserva son extraídas, casi en su totalidad, en la fracción de albúminas. A continuación se discuten los cambios en la concentración de proteínas de reserva en los embriones somáticos obtenidos de los diferentes tratamientos.

EXPRESION DE LAS PROTEINAS DE RESERVA EN CADA TRATAMIENTO

La expresión de proteínas de reserva fué estimada por la intensidad de las bandas correspondientes en geles de poliacrilamida. Para esto se procedió a extraer y purificar proteínas de reserva de semilla madura, utilizando el método descrito en el diagrama 3.

Como patrones de referencia se tomaron la 11S y una mezcla de 7S y 11S los cuales se cargaron en la parte derecha de los geles. La concentración empleada fué de $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ y cada carril se cargo con $10 \mu\text{l}$ (concentración final $10 \mu\text{g}$ totales).

Al analizar los geles de los tratamientos 1 L y 1-0 (fig. 10 y 11) se observa que el cambio en las condiciones de iluminación de fotoperíodo a oscuridad, no altera la concentración de proteínas de reserva de forma apreciable (tabla 3).

En los tratamientos 2, 3 y 4 se emplearon los extractos de semillas con 15, 30 y 45 días de madurez. De estos tratamientos solo el # 3 fue afectado, de manera negativa, en el contenido de

proteínas de reserva (tabla 3, figs. 12, 13 y 14).

Al aplicar los diferentes extractos por separado a partir del día 18 de cultivo, se afectó el contenido de proteínas de reserva. El tratamiento 5, el cual recibió extracto de semillas de 15 días de madurez, mostró una disminución en el contenido de 7S (con respecto a los controles 1 L y 1-0). La 11S no fué detectable en este tratamiento (tabla 3, fig. 15). El tratamiento 6 mostró una disminución sensible en cuanto a la presencia de ambas proteínas de reserva (tabla 3, fig. 16). El tratamiento # 7 presenta resultados similares al tratamiento 5 pero con una cantidad de 7S ligeramente mayor (tabla 3, fig. 17).

La aplicación de los extractos a partir del día 28 de cultivo tuvo los siguientes efectos. En el tratamiento 8 no se afectó el contenido de proteínas de reserva. En este tratamiento la 7S aumento ligeramente su concentración (tabla 3, fig. 18). El tratamiento 9 no mostró cambios en el contenido de 7S pero casi desapareció la 11S (tabla 3, fig. 19). En el tratamiento 10 la proteína 7S no mostró cambios en su concentración mientras que la concentración de 11s fué ligeramente favorecida (tabla 3, fig. 20).

Por último, si los extractos se aplicaron en la última semana de cultivo (a partir del día 35), se encontró que la concentración de ambas proteínas de reserva se afectó al emplear extracto de semillas de 15 días de madurez (tratamiento 11; tabla 3, fig. 21). En el tratamiento 12 la 7S no varió en su concentración y la 11S solo mostró una ligera disminución (tabla 3, fig. 22). El último tratamiento (el # 13) no mostró cambios en ninguna de las dos proteínas de reserva (tabla 3, fig. 23).

Lo anterior muestra una gran diversidad de respuestas en el contenido de proteínas de reserva. Esto impide establecer una relación entre los cambios en el contenido de proteínas de reserva y el tipo de extracto empleado y/o el tiempo de aplicación.

Las únicas tendencias que se encuentran son que:

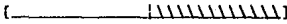
- La proteína 11S fue la más susceptible a mostrar variaciones. Esto puede estar relacionado con el hecho de que, a diferencia del embrión cigótico, el embrión somático presenta una cantidad muy pequeña de 11S la cual es menor aún que la de 7S; y
- El extracto de semillas de 30 días de madurez afecta la concentración de proteína 11S sin importar el tiempo de aplicación del extracto.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



53

FIGURA 10.- TRATAMIENTO 1 L



- Carril: 1.- Vacio.
 2.- Callo: albúminas.
 3.- Callo: globulinas.
 4.- Embrión 3 (globular y corazón): albúminas.
 5.- Embrión 3 (globular y corazón): globulinas.
 6.- Embrión 2 (torpedo joven): albúminas.
 7.- Embrión 2 (torpedo joven): globulinas.
 8.- Mezcla 7S y 11S.
 9.- 11S.
 10.- Vacio.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

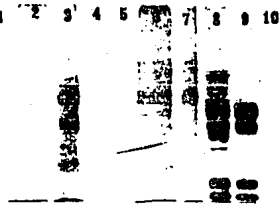
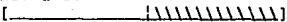


FIGURA 11.- TRATAMIENTO 1-O.



- Carril: 1.- Vacio.
 2.- Callo: albúminas.
 3.- Callo: globulinas.
 4.- Vacio.
 5.- Vacio.
 6.- Embrión 2 (torpedo joven): albuminas.
 7.- Embrión 2 (torpedo joven): globulinas.
 8.- Mezcla 7S y 11S.
 9.- 11S.
 10.- Vacio.

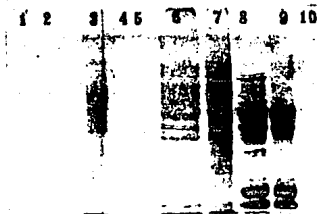


FIGURA 12.- TRATAMIENTO 2

[.....XXX/////]

- Carril: 1.- Vacio.
 2.- Callo: albúminas.
 3.- Callo: globulinas.
 4.- Vacio.
 5.- Vacio.
 6.- Embrión 2 (torpedo joven): albúminas.
 7.- Embrión 2 (torpedo joven): globulinas.
 8.- Mezcla 7S y 11S.
 9.- 11S.
 10.- Vacio.

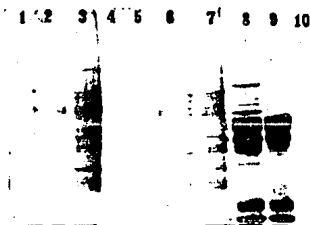


FIGURA 13.- TRATAMIENTO 3

[..!•XXXX/////////]

- Carril: 1.- Vacio.
 2.- Callo: albúminas.
 3.- Callo: globulinas.
 4.- Vacio.
 5.- Vacio.
 6.- Embrión 2 (torpedo joven): albúminas.
 7.- Embrión 2 (torpedo joven): globulinas.
 8.- Mezcla 7S y 11S.
 9.- 11S.
 10.- Vacio.

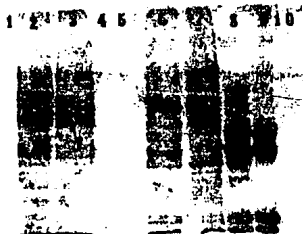


FIGURA 14. - TRATAMIENTO 4

[.....|XXXXX|/////]

- Carril: 1.- Vacio.
 2.- Callo: albúminas.
 3.- Callo: globulinas.
 4.- Vacio.
 5.- Vacio.
 6.- Embrión 2 (torpedo joven): albúminas.
 7.- Embrión 2 (torpedo joven): globulinas.
 8.- Mezcla 7S y 11S.
 9.- 11S.
 10.- Vacio.

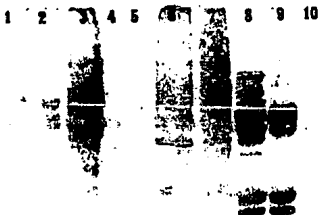


FIGURA 15. - TRATAMIENTO 5

[.....|.....|.....]

- Carril: 1.- Vacio.
 2.- Callo: albúminas.
 3.- Callo: globulinas.
 4.- Vacio.
 5.- Vacio.
 6.- Embrión 2 (torpedo joven): albúminas.
 7.- Embrión 2 (torpedo joven): globulinas.
 8.- Mezcla 7S y 11S.
 9.- 11S.
 10.- Vacio.

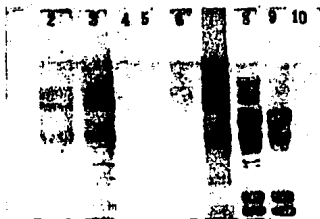


FIGURA 16.- TRATAMIENTO 6

[XXXXXXXXXXXXX]

- Carril: 1.- Vacio.
 2.- Callo: albúminas.
 3.- Callo: globulinas.
 4.- Vacio.
 5.- Vacio.
 6.- Embrión 2 (torpedo joven): albúminas.
 7.- Embrión 2 (torpedo joven): globulinas.
 8.- Mezcla 7S y 11S.
 9.- 11S.
 10.- Vacio.

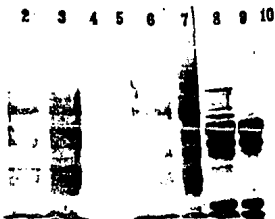


FIGURA 17.- TRATAMIENTO 7

[//////]

- Carril: 1.- Vacio.
 2.- Callo: albúminas.
 3.- Callo: globulinas.
 4.- Vacio.
 5.- Vacio.
 6.- Embrión 2 (torpedo joven): albúminas.
 7.- Embrión 2 (torpedo joven): globulinas.
 8.- Mezcla 7S y 11S.
 9.- 11S.
 10.- Vacio.

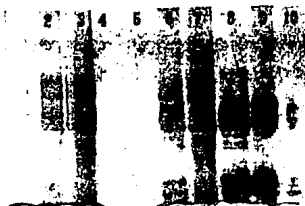


FIGURA 18.- TRATAMIENTO 8

Carril: 1.- Vacio.

2.- Callo: albúminas.

3.- Callo: globulinas.

4.- Vacio.

5.- Vacio.

6.- Embrión 2 (torpedo joven): globulinas.

7.- Embrión 2 (torpedo joven): globulinas.

8.- Mezcla 7S y 11S.

9.- 11S.

10.- Vacio.

' 2 ' 3 ' 4 5 6 7 ' 8 9 10

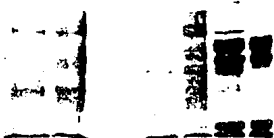


FIGURA 19.- TRATAMIENTO 9

Carril: 1.- Vacio.

2.- Callo: albúminas.

3.- Callo: globulinas.

4.- Vacio.

5.- Vacio.

6.- Embrión 2 (torpedo joven): albúminas.

7.- Embrión 2 (torpedo joven): globulinas.

8.- Mezcla 7S y 11S.

9.- 11s.

10.- Vacio.



FIGURA 20.- TRATAMIENTO 10

- Carril: 1.- Vacio.
 2.- Callo: albuminas.
 3.- Callo: globulinas.
 4.- Embrión 1 (torpedo maduro): albúminas.
 5.- Embrión 1 (torpedo maduro): globulinas.
 6.- Embrión 2 (torpedo joven): albúminas.
 7.- Embrión 2 (torpedo joven): globulinas.
 8.- Mezcla 7S y 11S.
 9.- 11S.
 10.- Vacio.



FIGURA 21.- TRATAMIENTO 11

- Carril: 1.- Vacio.
 2.- Callo: albúminas.
 3.- Callo: globulinas.
 4.- Vacio.
 5.- Vacio.
 6.- Embrión 2 (torpedo joven): albúminas.
 7.- Embrión 2 (torpedo joven): globulinas.
 8.- Mezcla 7S y 11S.
 9.- 11S.
 10.- Vacio.

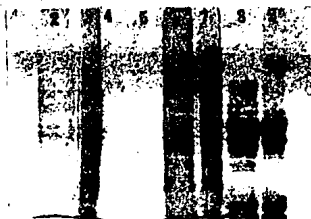


FIGURA 22.- TRATAMIENTO 12

- Carril: 1.- Vacio.
 2.- Callo: albúminas.
 3.- Callo: globulinas.
 4.- Vacio.
 5.- Vacio.
 6.- Embrión 2 (torpedo joven): albúminas.
 7.- Embrión 2 (torpedo joven): globulinas.
 8.- Mezcla 7S y 11S.
 9.- 11S.
 10.- Vacio.

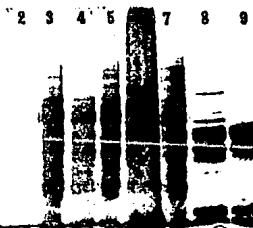


FIGURA 23.- TRATAMIENTO 13

- Carril: 1.- Vacio.
 2.- Callo: albúminas.
 3.- Callo: globulinas.
 4.- Embrión 1 (torpedo maduro): albúminas.
 5.- Embrión 1 (torpedo maduro): globulinas.
 6.- Embrión 2 (torpedo joven): albúminas.
 7.- Embrión 2 (torpedo joven): globulinas.
 8.- Mezcla 7S y 11S.
 9.- 11S.
 10.- Vacio.

CONVERSION DE LOS EMBRIONES OBTENIDOS EN CADA TRATAMIENTO

La conversión de los embriones obtenidos en cada tratamiento fue evaluada ya que es importante determinar si los cambios introducidos al protocolo de cultivo afectan esta característica. Si consideramos que los embriones somáticos son estructuras de propagación (Villegas, 1991; Krochko et al., 1992), la conversión no debe ser afectada de manera negativa por ningún cambio ya que se perdería el sentido de uso de los embriones.

La cantidad de embriones sembrados para determinar su porcentaje de conversión dependió de la cantidad de material de que se disponía en cada tratamiento.

Como se mencionó en materiales y métodos, se probó la conversión en medio MS al 50 % de concentración de sales con y sin extracto de semillas de 60 días de madurez (completamente maduras). En ambas condiciones se colocó el mismo número de embriones somáticos a probar por cada tratamiento. Al emplear el extracto se inhibió por completo la conversión de los embriones somáticos de todos los tratamientos incluyendo los controles. Esto sugiere que tal vez exista, en el extracto, algún factor o factores que influyen y/o regulan los procesos de conversión.

Al determinar los porcentajes de conversión de los embriones de los diferentes tratamientos mantenidos en oscuridad en medio MS al 50 % de concentración de sales se observó un fenómeno generalizado: la conversión se retrasó de 2 a 3 semanas, independientemente del tratamiento con respecto a los tiempos observados en los embriones del tratamiento control en fotoperíodo (1 L). Lo anterior muestra un efecto correspondiente a las condiciones de iluminación en las cuales se llevo a cabo la fase de desarrollo.

Existen reportes que ponen de manifiesto el papel de la luz en la germinación de semillas así como en el rompimiento de la dormancia, en semillas que son dormantes (Bewley y Black, 1982). En las semillas dormantes se da una serie de cambios en la capacidad de absorción del fitocromo que le permite transformarse de pigmento que absorbe a 660nm (región del rojo) a pigmento que absorbe a 730nm (región del rojo lejano). Algunos de estos cambios revierten en oscuridad de tal modo que la transformación no se da y la semilla no germina. Además, algunos de estos cambios sólo se dan en semillas hidratadas (Bewley y Black, 1982). Lo anterior es confirmado por los resultados obtenidos en el tratamiento mantenido en condiciones de fotoperíodo (1 L). Este fenómeno está relacionado con la capacidad fotosintética de los embriones, ya que al estar en fotoperíodo presentan un color verde brillante y al ser colocados en oscuridad pierden su coloración y muestran un tono amarillo pálido. Esta es una característica de embriones desarrollados en oscuridad (Villegas, 1991). Además, al colocarlos en el medio de conversión y antes de que se dé dicho proceso, adquieren un color verde y posteriormente comienza la elongación y la conversión a planta.

Al analizar los porcentajes de conversión observamos que el control en oscuridad (1-0) presentó un descenso notable con respecto

al control en luz (tabla 8). El resto de los tratamientos muestran una gran diversidad en los porcentajes de conversión. Algo que llama la atención es que los tratamientos 3, 8 y 13 superan el porcentaje de conversión de el tratamiento 1 L. Además estos tratamientos no son los que presentan las mayores concentraciones de proteínas de reserva. Se observan grandes variaciones en lo que respecta a proteínas de reserva lo cual impide establecer una relación entre la conversión con el contenido de material de reserva. Esto lleva a cuestionar la validez de la idea tradicionalmente manejada que establece la existencia de una relación entre el contenido de material de reserva en las semillas y su capacidad para germinar (porcentaje de germinación). Si esto fuera completamente cierto se esperaría que el tratamiento 3, el cual casi no contiene proteínas de reserva (tabla 3, fig. 13), no tuviera un porcentaje de conversión tan alto como el que muestra (tabla 8). Además, aplicando el mismo criterio, esperaríamos que el tratamiento 10 (tabla 3, fig. 20) mostrara un alto porcentaje de conversión y no es así (tabla 8). Lo anterior demuestra que el contenido de proteína de reserva puede influir más en el vigor de la plántula que en la calidad de la semilla. Además se ha observado que la pérdida en la capacidad de utilizar los materiales de reserva por el embrión afecta más la tasa de germinación que un bajo contenido de dichos materiales (Bewley y Black, 1982; Stuart, et.al.1988; Villegas, 1991).

Al analizar los resultados anteriores se confirma que el contenido en lo que corresponde a materiales de reserva son debidos a la presión de selección ejercida por el hombre, al desarrollar variedades mejoradas a lo largo de la historia, que a los requerimientos propios del embrión (Villegas, 1991).

El vigor de las plantas obtenidas de los diferentes tratamientos fue muy similar a excepción de 4 tratamientos. Los tratamientos 3 y 9 fueron los que dieron plantas con tallos y pecíolos más vigorosos. Los tratamientos 5 y 6 produjeron plantas con poco vigor.

En lo que respecta a la presencia de raíces solo los tratamientos 3 y 12 destacan del resto de los tratamientos ya que mostraron raíces muy abundantes. Esto fue notorio ya que el sistema radical de los embriones somáticos de alfalfa se desarrolla, por lo general, lentamente (Villegas, 1991).

Por último, las plantas obtenidas de embriones sometidos a los tratamientos 3, 9 y 10 fueron las que mostraron follaje más abundante lo que indica que estos tratamientos, de alguna forma, favorecen el desarrollo de la parte aérea de dichas plantas.

De lo anterior se puede asegurar que no existe una correlación clara entre los diferentes tratamientos y su efecto sobre la conversión de embriones. Tal vez se puede señalar el caso del tratamiento # 3 el cual es el que produjo las mejores plantas y de los mayores porcentajes de conversión, aunque en el resto de los parámetros evaluados ocupa posiciones bajas.

TABLA 8.- EFECTO DE LA ADICION DE EXTRACTOS AL MEDIO DE CULTIVO, SOBRE LA CONVERSION DE EMBRIONES SOMATICOS

TRAT.	EMBRIONES		GERMINACION	
	SEMRADOS	GERMINADOS	%	ORDEN
1 L	80	60	75	5
1 0	20	10	50	11
2	19	11	58	8
3	52	46	88.4	3
4	62	21	33.9	13
5	39	12	31	14
6	152	77	50.6	10
7	77	44	57.1	9
8	9	8	88.8	2
9	81	65	80.2	4
10	120	71	59.1	7
11	52	26	50	12
12	81	5	64.1	6
13	80	76	95	1

TRATAMIENTOS QUE SUPERAN AL CONTROL EN FOTOPERIODO

ANALISIS HOLISTICO DEL EFECTO DE LA ADICION CADA UNO DE LOS EXTRACTOS AL MEDIO DE CULTIVO

El extracto de semillas de 15 días de madurez al igual que los otros extractos favoreció la respuesta al compararla con el control en oscuridad. No tuvo un efecto claro en cuanto a rendimiento y eficiencia. Produjo efectos diversos con respecto a la concentración de proteínas de reserva ya que el tratamiento 8 favoreció la expresión de 7S pero en los tratamiento 5 y 11 este mismo extracto redujo la expresión de 7S y 11S. También redujo casi al 50 % la concentración de albúminas con respecto al control en oscuridad y favoreció la concentración de globulinas en el tratamiento 8 pero la redujo en el tratamiento 11. En lo que respecta a conversión se encuentra, de nuevo, una diversidad de respuestas. En los tratamientos 5 y 11 indujo una baja conversión, sin embargo el tratamiento 8 presenta un 88.8 % de conversión siendo superado sólo por el tratamiento 13.

Al utilizar extracto de semilla de 30 días de madurez se encontró que este extracto favoreció respuesta, rendimiento y eficiencia. Sin embargo no mostró el mismo efecto en lo que toca a proteínas de reserva. La concentración de albúminas y globulinas fué favorecida en el tratamiento 9 (esto es al aplicar el extracto a partir del día 28 de cultivo). También en este tratamiento (el 9) se vic favorecida la conversión de embriones a plantas. A pesar de esto los tratamientos 6 y 12 no mostraron un efecto tan favorable.

Finalmente, el extracto de semillas de 45 días de madurez favoreció la respuesta, casi no influyó en el rendimiento y, por lo tanto, su efecto sobre la eficiencia fué bajo. El empleo del extracto a partir del día 28 de cultivo favoreció la síntesis de 11s pero al emplearse desde el día 18 inhibió la expresión de dicha proteína. Al adicionarlo en la última semana (tratamiento 13) favoreció la concentración de albúminas mas no la de globulinas. El tratamiento 7 fué el mas favorable en lo concerniente a concentración de globulinas pero su contenido de albúminas fué bajo. En lo tocante a la conversión este extracto indujo el mayor porcentaje (95 %) en el tratamiento 13 pero los tratamientos 7 y 10 no mostraron un porcentaje de conversión tan alto.

De lo anterior se desprende que no es posible establecer una correlación entre el extracto empleado y un efecto positivo en todos y cada uno de los diferentes parámetros evaluados. El extracto que mostró un comportamiento más uniforme en su influencia sobre los parámetros evaluados fué el de semillas de 30 días de madurez, pero no es claro que este extracto tenga un efecto favorable sobre todos ellos. Además, los efectos de los extractos varían conforme el momento de su aplicación, de tal modo que es probable que el día 28 de cultivo sea el más conveniente para la aplicación de los extractos. Todo lo anterior indica que los diferentes parámetros evaluados son independientes entre sí, lo cual dificulta su estudio y manejo.

Los bajos niveles en la acumulación de proteínas de reserva en embriones somáticos, cuya concentración es apenas del 10% de la encontrada en embriones cigóticos (Stuart et al., 1988), semejan a

las encontradas en semillas embebidas (Feirer y Simon, 1992). Estas bajas concentraciones pueden estar influidos por, o ser consecuencia de diversos factores.

La acumulación de proteínas de reserva esta relacionada con la abundancia del mRNA que las codifica (Krochko et al., 1992). Esto coincide con la endoreduplicación del genoma que se da exactamente antes de iniciarse la síntesis de estas proteínas (Larkins, 1981). Si se falla en la endoreduplicación del genoma esto repercute en una baja concentración de mRNA. En 1992 Krocko y colaboradores reportaron una concentración de mRNA en embriones somáticos de alfalfa menor que en semilla. Por lo tanto, éste es un punto en el cual se debe poner especial atención.

En diferentes especies como algodón, chícharo y alfalfa se han encontrado que los polipéptidos que integran a las proteínas de reserva son sintetizados de manera diferencial (Croissant-Sych y Bopp, 1988; Villegas, 1991), lo que indica una posible regulación genética dependiente de señales internas. Una alteración de dicha regulación podría aumentar o disminuir la cantidad de material de reserva en la semilla ρ , en este caso, en el embrión somático.

Cuando se inicia la desecación la acumulación de proteínas de reserva en semilla no varía, lo cual indica que la desecación no afecta el proceso de almacenamiento de proteínas de reserva (Croissant-Sych y Bopp, 1988). Esto se observó al realizar el proceso de embriogénesis somática en oscuridad en donde, al parecer, había un menor contenido de agua en los embriones. Sin embargo no se puede aseverar aún nada pues no se realizaron estimaciones de aumento o disminución en el peso seco de los embriones obtenidos de cada tratamiento.

Si se considera que la movilización de materiales de reserva está controlada por el crecimiento del eje embrionario (Bewley y Black, 1982) y que la acumulación de proteínas de reserva en semillas se asocia con la fase de expansión celular (Higgins, 1984; Villegas, 1991) es factible que la falta de acumulación de estas proteínas esté dada por una falta de disminución en la tasa de división celular del embrión somático.

Otro posible punto en donde puede estar afectada la producción y/o acumulación de proteínas de reserva es el de la deposición del material de reserva. El mecanismo de síntesis y deposición de proteínas de reserva ha sido propuesto como análogo al de síntesis y secreción de glicoproteínas en células de mamífero (Larkins, 1981). Esto coincide con los requerimientos de glicosilación de la proteína de reserva 7S mas no con la 11S pues al parecer esta última no requiere glicosilación (Villegas, 1991). El mRNA de las proteínas de reserva es transportado al retículo endoplásmico rugoso en donde se sintetiza el polipéptido el cual es posteriormente transportado a membranas vacuolares (Larkins, 1983). Es sabido que la traslocación de este mRNA implica un péptido señal (Higgins, 1984). Una falla en la glicosilación o en el péptido señal podría bajar el contenido de proteínas de reserva en el embrión somático. Sin embargo tal parece que la glicosilación se está realizando, pues la proteína de reserva más abundante en el embrión somático (la 7S) es la que requiere glicosilación. A pesar

de lo que se conoce sobre la síntesis y almacenamiento de estas proteínas aún se desconoce mucho sobre este proceso y existen muchas especulaciones sobre todo en lo que respecta al mecanismo de su transporte y almacenamiento.

Por otro lado, debemos considerar que la acumulación de una proteína es reflejo del equilibrio establecido entre la tasa de síntesis y la de degradación. Las proteínas de reserva son estables por un largo período que va desde la fase de deposición hasta la imbibición y germinación. Ante esto la tasa de acumulación es igual a la tasa de síntesis de estas proteínas en la semilla (Higgins, 1984). Es generalmente aceptado que las proteínas de reserva son hidrolizadas hasta aminoácidos por enzimas proteolíticas. Los aminoácidos son transportados posteriormente a los ejes de crecimiento (Ashton, 1976; Finkelstein y Crouch, 1987).

Considerando lo anterior y que el eje embrionario del embrión somático no detiene su división celular se deben realizar estudios sobre la existencia y, en su caso, cuantificación de tales enzimas proteolíticas, ya que puede estar alterado alguno de los sistemas de control que existen en plantas para estas enzimas. Entre estos mecanismos de control se pueden mencionar los siguientes:

- Control hormonal de la síntesis de novo;
- Inhibidores endógenos; y
- Compartimentalización.

Los dos primeros mecanismos son de los más importantes. En tejidos de almacenamiento y semillas se han encontrado inhibidores de proteasas tales como el inhibidor de tripsina en soya (Hill y Breidenbach, 1974; Ashton, 1976; Larkins, 1983).

Todo lo anterior nos muestra una similitud entre los embriones somáticos a nivel funcional (como estructuras de propagación) así como a nivel morfológico. Sin embargo a nivel bioquímico las diferencias se acrecentan, pues aún cuando ambos tipos de embriones (cigóticos y somáticos) sintetizan proteínas de reserva, las cuales son específicas de tejido, los niveles de estas proteínas que se han encontrado en ambos tipos de embriones son muy diferentes.

C O N C L U S I O N E S

- La síntesis de proteínas de reserva en el embrión cigótico se inicia entre los días 30 y 45; en tanto que la acumulación se da entre los días 45 y 60.
- En el día 60 todas las proteínas de reserva se encuentran en forma insoluble (empaquetadas) en la semilla.
- La primera proteína de reserva que se sintetiza en el embrión cigótico es la 7S y posteriormente se sintetiza la 11S.
- La proteína más abundante en el embrión cigótico es la 11S.
- El cambio en las condiciones de iluminación durante el cultivo, no altera la concentración de proteínas de reserva en los embriones somáticos.
- Los embriones somáticos siguen la ruta de desarrollo siguiente: globular → corazón → torpedo joven → cotiledonar de una manera normal y reproducible, pero al ser sometidos a condiciones de oscuridad en la fase de desarrollo, la ruta se detiene en el estadio correspondiente a torpedo joven. Esta sincronía no favorece la expresión de proteínas de reserva.
- La elevación de la temperatura, en el cuarto de incubación, inhibe el desarrollo de los embriones somáticos más allá del estadio de torpedo joven.
- Existe un factor en los extractos de semillas de 45 días que reduce o neutraliza el efecto de la elevación de temperatura;
- Los datos cuantitativos muestran que las proteínas (albúminas y globulinas) son más abundantes en el estadio de torpedo joven. Esto es debido a que en el estadio de torpedo joven la maquinaria de síntesis de proteínas es funcional y aún no se ha iniciado el proceso de conversión.
- El extracto de semillas con 30 días de madurez es el que muestra un efecto, de aumento, más homogéneo en los diferentes parámetros evaluados.
- El efecto de los extractos está influenciado por el momento en el que sean adicionados, ya que un mismo extracto tuvo efectos diferentes dependiendo del día a partir del cual se aplicó al cultivo.
- Al parecer, el tiempo más conveniente para la adición de los extractos es el día 28 de cultivo.
- Ninguno de los tratamientos indujo de manera notable la

concentración de proteínas de reserva. Esto hace suponer que la síntesis de las proteínas de reserva depende de la fisiología del tejido, es decir que los factores químicos son importantes pero también lo son los factores físicos y biológicos como pueden ser el medio de cultivo y las condiciones en las cuales se desarrolla el proceso.

- La proteína de reserva que mostró mayores variaciones como consecuencia de los tratamientos fue la 11S. Esto es reflejo de la alteración en el orden y cantidad de síntesis de las proteínas de reserva. En las semillas la primer proteína de reserva que es sintetizada es la 7S, pero la más abundante es la 11S. En el embrión somático se sintetiza primero la 11S y luego la 7S la cual es la más abundante. Tal vez los tratamientos modificaron la síntesis de ambas, pero al ser la 11S la menos abundante cualquier cambio en la cantidad de esta proteína fue mas notorio que si el cambio ocurría en la síntesis de 7S.
- La aplicación de los tratamientos en los que se emplearon los tres extractos de manera consecutiva, para simular el proceso que ocurre in-vivo en condiciones in-vitro, sugiere que no existe paralelismo a nivel bioquímico entre los embriones somáticos y los embriones cigóticos.
- La conversión de los embriones somáticos no es dependiente de la concentración de proteínas de reserva.
- Los parámetros cuantitativos y cualitativos evaluados así como la conversión dependen de diversos factores de tal forma que ninguno de los factores físicos o químicos probados afectaron a todos los parámetros por igual.
- Los aspectos de evaluación cuantitativa (respuesta y rendimiento) muestran una independencia total de los aspectos cualitativos (concentración de proteínas de reserva y conversión).

SUGERENCIAS

- Trabajar para lograr un aumento en el contenido de proteínas de reserva empleando factores o sustancias que detengan la división celular ya que se sabe que el embrión cigótico pasa por una serie de divisiones celulares limitadas y posteriormente se da un crecimiento celular. Es durante este crecimiento celular, y una vez que han cesado las divisiones celulares, cuando se efectúa la acumulación de los materiales de reserva. El embrión somático no detiene sus divisiones celulares y ello puede estar influenciando la acumulación de las proteínas de reserva.
- Se deben variar las condiciones de cultivo, ya que las actuales tal vez sean más propicias para que el embrión somático adopte la ruta de la germinación. Tal vez produciendo un estress al embrión somático se logre inducir la acumulación de proteínas de reserva así como inducir la latencia.

B I B L I O G R A F I A

- Ashton, F. M. (1976). Mobilization of storage protein of seeds. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 27: 95-117.
- Bewley, J. D. & Black, M. (1982). *Physiology and Biochemistry of seeds*. Vol. 1 Ed. Verlag, Berlin, West Germany. pp 375.
- Bonifacino, J. S., Cosson, P. & Klausner, R. D. (1990). Colocalized Transmembrane Determinants for ER Degradation and Subunit Assembly Explain the Intracellular Fate of TCR and Chains. *Cell* 63: 503-13.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals. Biochem.* 72:248-254.
- Chasan, R. (1992). Developing somatic Embryos. *The Plant Cell* 4: 367-68.
- Cibrián, T. A. M. (1991). Expresión y acumulación de material de reserva en embriones somáticos de alfalfa (Medicago sativa L.). Tesis profesional para obtener el título de Biólogo. U.N.A.M. Facultad de Ciencias, México, D.F. pp 245
- Craig, R. L., Chestnut, R. S., Shaw, K. L. & Larkins, A. B. (1989). Immunolocalization of avenin and globulin storage proteins in developing endosperm of Avena sativa L. *Planta* 178: 315-24.
- Croissant-Sych, Y. & Bopp, M. (1988). Formation and Degradation of Storage Proteins in the Embryo of Sinapis alba. *J. Plant Physiol.* 32: 520-28.
- Crouch, M. L. & Sussex, L. M. (1981). Development and storage protein synthesis in Brassica napus L. *in-vivo* and *in-vitro*. *Planta* 153: 64-74.
- Crouch, M. L. (1982). Non-zygotic embryos of Brassica napus contain embryo specific storage proteins. *Planta* 156: 520-24.
- Damher, M. L., Hildebrand, D. F. & Collins, G. B. (1982). Comparative protein accumulation patterns in soybean somatic and zygotic embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 28P: 106-14.
- Feirer, R. P. & Simon, P. W. (1992). Protein synthesis during carrot embryogenesis and germination: comparison of zygotic, somatic and DFMA-treated somatic embryos.
- Finney, D. J. 1980. *Statistics for Biologist*. Science Paperbacks. Ed. Chapman and Hall. London, England. pp 165.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA'

- Finkelstein, R. R. & Crouch, M. L. (1987) Hormonal and osmotic effects on developmental potential of maturing rapeseed. Hortsc. 25 (5): 797-800.
- Fowler, M. W. (1983). Commercial applications and economic aspects of mass plant cell culture. En: Plant biotechnology. Mantell, S. H. & Smith, H. eds. Ed. Cambridge University Press, London, England. pp 1-35.
- Fujii, J. A. A., Slade, D., Aguirre-Rascon, J. & Redenbaugh, K. (1992). Field planting of alfalfa artificial seeds. In Vitro Cell Dev. Biol. 28P: 73-80.
- Fujimura, T. y Komamine, A. (1979). Synchronization of somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. Plant Physiol. 64:162-164.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50:151-158.
- García de los Santos, G. (1987). Selección de líneas clonales de alfalfa (Medicago sativa L.) por su capacidad productiva y calidad de semillas. Tesis de Maestría. U. A. de Chapingo, Montecillos, México. pp 134.
- Hames, B. D. & Rickwood, D. (1981). Gel electroforesis of proteins: a practical approach. Ed. Hames & Rickwood. London, England. pp 1-10.
- Hernández, P. V. (1989). Morfología y citoquímica de la ontogenia de los embriones somáticos de Medicago sativa L. var. A70.34. Tesis profesional para obtener el título de Biólogo. U.N.A.M. ENEP-Unidad Zaragoza. México, D.F.
- Higgins, T. J. V. (1984). Synthesis and regulation of major protein in seeds. Ann. Rev. Plant Physiol. 35: 191-221.
- Hill, J. E. & Breidenbach, R. W. (1974). Proteins of soybean seeds: II. Accumulation of the major protein components during seed development and maturation. Plant Physiol. 53: 747-51.
- Jensen, W. A. & Salisbury, F. B. (1984). Botany. Wadsworth publishing comp. inc. Belmont California E. U. A.
- Kondo, K. Sugimoto, T. & Siao, K. (1986). Changes in storage protein components of developing soybean seeds (Glycine max var. Enrei). Agrc. Biol. Chem. 50 (3): 581-87.
- Krochko, J. E., Pramanik, S. K. & Bewley, J. D. (1992). Contrasting storage protein synthesis and messenger RNA accumulation during development of zygotic and somatic embryos of alfalfa (Medicago

sativa L.). Plant Physiol. 99:46-53.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.

Larkins, B. A. (1981). Seed storage proteins: Characterization and biosynthesis. En: The Biochemistry of plants: a comprehensive treatise. Vol 6. P. K. Stumpf & E. E. Conn, eds. Academic press, New York, E. U. A.

Larkins, B. A. (1983). Genetic Engineering of seed storage proteins. En: Genetic Engineering of plants. Kosuge, Meredith & Hollaender Eds. Basic Life Sciences Vol. 26.

Lee, T. S. G. (1985). Protein pattern changes in the developing seeds of beans (Phaseolus vulgaris L.). Turrialba 35 (4): 377-81.

Meijer, E. G. & Brown, D. C. W. (1987). A novel system for rapid high frequency somatic embryogenesis in Medicago sativa sp. falcata. Physiol. Plant. 69 (6): 91-96.

Millerd, A. (1973). Protein synthesis in developing cotyledons of legumes. Plant Physiol. 51: 1005-17.

Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.

Raghavan, V. (1976). Experimental embryogenesis in vascular plants. Academic press, New York, E. U. A.

Rojas, M. M. L. (1991). Estudio inmunológico comparativo entre las proteínas de reserva producidas por embriones somáticos y cigóticos de alfalfa Medicago sativa L. Tesis Profesional para obtener el título de biólogo. U. N. A. M. Facultad de ciencias, México, D.F. pp 150.

Salisbury, F. B. & Ross, C. W. (1985). Plant Physiology. 3ª ed. Ed. Wadsworth Publishing Company. E. U. A.

Sharp, W. R., Sondahl, M. R., Caldas, L. S. & Maraffa, S. B. (1980). The physiology of in vitro asexual embryogenesis. Hortic. Rev. 77 (2) 268-310.

Stuart, D. A., Nielsen, J. and Nichol, J. W. (1988 b). Expression of 7S and 11S alfalfa seed storage proteins in somatic embryos. J. Plant Physiol. 32: 134-37.

Stuart, D. A., Nelsen, J., Strickland, S. G. and Nichol, J. W. (1985). Factors affecting departmental processes in alfalfa cell cultures. In Tissue culture in forestry and agriculture. Ed. by Randolph R. Henke pleum Publ. Corp. pp 59-73.

Sun, S. M., Mutschler, A., Bliss, F. A. & Hall, T. C. (1978). Protein synthesis and accumulation in bean cotyledons during growth. *Plant Physiol* 61:918-23.

Thorpe, T. A. (1981). *Plant tissue culture. Methods and applications in agriculture.* Academic Press Inc. E. U. A. pp 1-40.

Thorpe, T. A. & Biondi, S. (1984). *Conifers.* En: *Hand book of plant cell culture.* Vol. 2 Ed. New York. E. U. A.

Villegas, G. T. L. (1986). *Developmental study of somatic embryogenesis in Medicago sativa L.* Proyecto de trabajo experimental para tesis doctoral. Depart. of Biology University of Ottawa, Can. pp 1-27.

Villegas, G. T. L. (1991). *Embriogénesis somática en Medicago sativa L. y la fisiología de su desarrollo.* Tesis doctoral ENCB-IPN México, D.F. pp 193.

Warren, G. S., and Fowler, M. W. (1977). A physical method for the separation of various stages in the embryogenesis of carrot cell cultures. *Plant Science Letters.* 9:71-76.

Wilson, C. L. & Loomis, W. E. (1980). *Botanica.* Unión Tipográfica, Ed Hispano-Americana, S. A. México.

APENDICES

APENDICE 1
 MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS EN LA EMBRIOGENESIS

MEDIO B5
 (Gamborg, et-al, 1968 modificado por Villegas, 1987)

<u>MACRONUTRIENTES</u>	mg/l
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	150
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	500
KNO ₃	2528
(NH ₄) ₂ CIT. DIBASICO	2827
<u>MICRONUTRIENTES</u>	
MnSO ₄ * H ₂ O	10
H ₃ BO ₃	3
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	2
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	0.25
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	0.025
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	0.75
KI	37.3
Na ₂ EDTA	37.3
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	27.8
<u>VITAMINAS</u>	
Ac. Nicotínico	1
Tiamina * HCl	10
Piridoxina * HCl	1
Mio - inositol	100
Adenina	1

APENDICE 2
MEDIO EMPLEADO PARA LA CONVERSION

MEDIO MS
(Murashige and Skoog 1962)

<u>MACRONUTRIENTES</u>	mg/l.
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	370
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
KH ₂ PO ₄	170
 <u>MICRONUTRIENTES</u>	
H ₃ BO ₃	6.2
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	8.5
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	0.025
KI	0.88
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	0.025
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	0.25
MnSO ₄ * H ₂ O	16.9
Na ₂ EDTA	37.3
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	27.8
 <u>VITAMINAS</u>	
Glicina	2.0
Ac. Nicotínico	0.5
Piridoxina * HCl	0.5
Tiamina * HCl	1.0
Mio - inositol	100.0

A P E N D I C E 3

<u>Solución</u>	<u>Composición</u>
I Acrilamida 30%	30g de acrilamida en 100 ml de agua bidestilada
II Bisacrilamida 2%	2g de bisacrilamida en 100 ml de agua bidestilada
III Tris 1M pH 8.8	36.3g de Tris-HCl en 100 ml de agua bidestilada
IV Tris 1M pH 6.8	21.1g de Tris-HCl en 100 ml de agua bidestilada
V SDS 20%	20g de dodecil sulfato sulfato de sodio en 100 ml de agua bidestilada
VI Amortiguador de muestra	SDS 5g, glicerol 5 ml, Tris-base 2,44g, 0.01% de azul de bromofenol y 5% de 2 β -mercapto etanol en 50 ml de agua bidestilada
VII Amortiguador de corrida	3.02g de Tris-base, glicina pH 8.4 en 100 ml de agua bidestilada
VIII Fijador y colorante	Metanol 50%, ácido acético glacial 10%, azul de Coomassie 0.25% y 50% de agua bidestilada
IX Solución destefidora	Metanol 40%, ácido acético glacial 10% y agua bidestilada 50%.

Preparación del gel de separación.

La concentración del gel de separación fue del 10% de acrilamida, preparándose de la manera siguiente (volumen total 15 ml.):

Acrilamida	5 ml
Bisacrilamida	2 ml
Tris pH 8.8	5.6 ml
SDS	75 μ l
H ₂ O	2.2 ml
TEMED*	6.5 μ l

PSA* (persulfato de amonio) 45 μ l

* Catalizadores para polimerizar (Temed= N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamin; PSA= Persulfato de amonio).

La mezcla de polímeros se vertió en medio de las placas de electroforesis, perfectamente limpias y montadas en el aparato, se dejó aproximadamente un espacio de 1 cm sin llenar para colocar posteriormente el gel concentrador.

Para lograr que el gel tuviera un frente homogéneo se agregaron unas gotas de SDS al 2%. Una vez polimerizado el gel de separación se retiró el SDS y se colocó un peine con un total de 10 carriles, antes de añadir el gel concentrador.

El gel concentrador se preparó a una concentración de 5% de acrilamida mezclando:

Acrilamida	850 μ l
Bisacrilamida	350 μ l
Tris pH 6.8	620 μ l
SDS	25 μ l
H ₂ O	3.4 μ l
TÉMED	5 μ l
PSA	<u>25 μl.</u>
Volumen total	5 ml

Condiciones de corrimiento de las muestras.

Una vez cuantificados los extractos de proteínas, se prepararon para la electroforesis. Las muestras fueron preparadas en una concentración de 1 μ g/ μ l. De cada muestra se preparó un volumen total de 500 μ l, tomando la cantidad necesaria de proteína para tener 500 μ g, más 125 μ l de amortiguador de muestra (concentración de 4X) y 25 μ l de 2 β - mercaptoetanol.

Las muestras se agitaron en un vortex por 15 segundos, se colocaron en un baño de agua hirviendo por dos minutos, nuevamente se agitaron y se volvieron a hervir por dos minutos.

Las muestras ya preparadas se colocaron en los carriles con ayuda de una jeringa Hamilton (volumen colocado: 10-20 μ l).

El corrimiento de los geles requirió, aproximadamente, una hora a una voltaje constante de 100 volts. Pasado este tiempo, el aparato se apagó y se desensambló, los geles se sacaron con cuidado y se marcó el extremo inferior izquierdo de cada uno de ellos (carril 1).

Teñido y desteñido de los geles.

Los geles se colocaron en recipientes individuales y se sumergieron en la solución fijadora y teñidora aproximadamente por dos horas. El desteñido de los geles se llevó a cabo retirando el colorante y colocando la solución desteñidora, hasta obtener una buena definición de las bandas de proteínas.