



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

**ESTUDIO BIOQUIMICO DURANTE LA FASE DE
INDUCCION DEL PROCESO DE EMBRIOGENESIS
SOMATICA EN ALFALFA (MEDICAGO SATIVA L.)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

LICENCIATURA EN BIOLOGIA

P R E S E N T A :

ANA ALICIA FERNANDEZ ORTIZ

MEXICO, D. F.

SEPTIEMBRE 1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

C O N T E N I D O

	Pag.
RESUMEN	(i)
ABREVIATURAS	(ii)
INDICE DE DIAGRAMAS, FIGURAS Y TABLAS	(iii)
I.- INTRODUCCION	(1)
1.- ANTECEDENTES	(1)
1.1) <u>Cultivo de tejidos vegetales</u>	(1)
1.1.1) Organogénesis	
1.1.2) Embrionogénesis	
1.2) <u>Embrionogénesis somática en alfalfa</u>	(3)
1.3) <u>Importancia de la alfalfa</u>	(5)
1.3.1) Importancia de la alfalfa en México	
1.3.2) Origen y evolución	
1.3.3) Clasificación y descripción botánica	
1.3.3.1) Taxonomía	
1.3.3.2) Morfología	
1.4) <u>Diferenciación celular</u>	(10)
1.4.1) Bases de la diferenciación celular	
1.4.2) Proteínas involucradas en la diferenciación celular	
1.5) <u>Caracterización de proteínas en geles de SDS PAGE</u>	(17)
1.6) <u>Análisis densitométrico de los geles teñidos con azul de Coomassie</u>	(19)
2.- JUSTIFICACION	(20)
II.- OBJETIVOS	(22)
2.1) <u>General</u>	
2.2) <u>Particulares</u>	
III.- HIPOTESIS	(22)

IV.- MATERIALES Y METODOS	(23)
4.1) <u>Material biológico</u>	(23)
4.2) <u>Establecimiento del cultivo aspéptico</u>	(23)
4.2.1) Preparación de medios de cultivo	
4.2.2) Desinfestación del material biológico	
4.2.3) Condiciones de incubación	
4.3) <u>Protocolo de embriogénesis somática</u>	(25)
4.4) <u>Selección de germoplasma no embriogénico de la variedad Moapa</u>	(25)
4.4.1) Transplante de in vitro a in vivo de la variedad Moapa	
4.5) <u>Propagación del material vegetativo</u>	(27)
4.6) <u>Manipulación para usar un solo protocolo de embriogénesis somática</u>	(29)
4.7) <u>Análisis de proteínas tempranas</u>	(29)
4.7.1) Extracción de proteínas	
4.7.2) Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	
4.7.3) Caracterización de proteínas por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida	
4.7.3.1) Preparación del gel de corrida	
4.7.3.2) Cargado y corrido de las muestras	
4.7.3.3) Teñido y destañado de los geles	
4.8) <u>Cinética de callos de A70.34 y de Moapa</u>	(36)
4.9) <u>Prueba fisiológica</u>	(36)
V.- RESULTADOS Y DISCUSION	(38)
VI.- CONCLUSIONES	(71)
VII.- LITERATURA CITADA	(74)
IX.- APENDICES	(78)

R E S U M E N

La capacidad que presentan algunas células vegetales (somáticas) para inducir la formación de embriones (embriogénesis somática) no se ha logrado en todas las especies vegetales, destacando aquellas con mayor importancia agronómica como es el caso de gramíneas y leguminosas

El sistema de embriogénesis somática en alfalfa representa un modelo de estudio, ya que tiene la capacidad de regenerar dos tipos de callos embriogénico y no embriogénico. En el presente trabajo se llevó a cabo un estudio comparativo de los patrones de síntesis de proteínas en una línea embriogénica y una no embriogénica de alfalfa durante la fase de inducción del proceso de embriogénesis somática. Se realizó una cinética de cultivo haciendo extracción de proteínas cada tercer día iniciando el día 0 y concluyendo el 18. La evaluación se llevó a cabo comparando la línea embriogénica con la no embriogénica a nivel morfológico y bioquímico, en este último caso tomando el contenido de proteínas totales así como el patrón de bandeo de proteínas durante la cinética de cultivo.

A nivel morfológico la diferencia entre un callo embriogénico y no embriogénico empieza a partir del día 12 acentuándose el día 18 donde la línea embriogénica presenta un callo friable, poco abundante y con la formación de embriones somáticos, así como de centros meristemáticos; en cambio la línea no embriogénica presenta un callo amarillento, abundante y con nula formación de embriones somáticos. El callo embriogénico presenta mayor concentración de proteínas totales que el callo no embriogénico.

Existe un polipéptido de 83 kD que sólo se presentó en la línea embriogénica desde el día 3 hasta el día 18 de cultivo, en tanto que la línea no embriogénica presenta un polipéptido de 75kD que es específico de ella.

A pesar de que se encontraron diferencias durante la cinética de cultivo, no es posible precisar el papel biológico que tienen éstos polipéptidos, por consiguiente las investigaciones posteriores deben enfocarse a definir si tienen un papel durante la embriogénesis somática, para conocer si juegan un papel regulatorio durante la diferenciación.

ABREVIATURAS

AG-3 Acido giberélico

AIA Acido indol-3-acético

AIB Acido indol-butírico

ANA Acido naftalén-acético

BSA Albúmina de suero bovino

B₅ Medio de cultivo de Gamborg (1968)

D.S. Desviación estándar.

EDTA Etilen diamino tetracetato de sodio

MS Medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962)

PMSF Fluoruro de metil fenil sulfonato

PSA Persulfato de amonio

SDS-PAGE Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.

TEMED N,N,N,N -tetrametiletildiamina

2,4 D Acido 2,4-diclorofenoxiacético.

INDICE DE DIAGRAMAS, FIGURAS Y TABLAS.

- Diagrama 1. Protocolo de embriogénesis somática en alfalfa.
- Diagrama 2. Extracción de proteínas de los callos embriogénicos y no embriogénicos de alfalfa.
- Figura 1. Representación esquemática de las expresiones morfogénicas en células competentes y no competentes de un inóculo cultivado.
- Figura 2. Callos de 18 días de cultivo de la línea embriogénica y no embriogénica.
- Figura 3. Embrión somático de Moapa de 18 días de cultivo.
- Figura 4. Curva tipo utilizada en la evaluación del contenido de proteínas en callos embriogénicos y no embriogénicos de alfalfa
- Figura 5. Curva tipo utilizada en la determinación del peso molecular de callos de A70.34.
- Figura 6. Curva tipo utilizada en la determinación del peso molecular de callos de Moapa.
- Figura 7. Patrones electroforéticos durante la cinética de cultivo para A70.34.
- Figura 8. Patrones electroforéticos durante la cinética de cultivo para Moapa.
- Figura 9. Variación en la concentración de proteínas durante la cinética de cultivo.
- Figura 10. Patrones electroforéticos en la prueba fisiológica de callos de Moapa.
- Tabla 1. Producción de alfalfa verde cosechada en México en 1983
- Tabla 2. Enraizamiento de internodos de la línea F.1.1.
- Tabla 3. Enraizamiento de internodos de la línea A70.34.
- Tabla 4. Protocolo de embriogénesis somática.
- Tabla 5. Respuesta, rendimiento y eficiencia de embriones somáticos de A70.34
- Tabla 6. Resultados de enraizamiento de A70.34.
- Tabla 7. Resultados de la manipulación para usar un solo protocolo de embriogénesis somática.

- Tabla 8. Log_{10} de los marcadores de peso molecular.
- Tabla 9. Morfología de A70.34 durante la cinética de cultivo.
- Tabla 10. Morfología de Moapa durante la cinética de cultivo.
- Tabla 11. Patrón de aparición de proteínas durante la cinética de cultivo para A70.34.
- Tabla 12. Patrón de aparición de proteínas durante la cinética de cultivo para Moapa.
- Tabla 13. Concentración relativa de las proteínas de A70.34 a lo largo del cultivo.
- Tabla 14. Concentración relativa de las proteínas de Moapa a lo largo del cultivo.
- Tabla 15. Comparación de la presencia de proteínas equivalentes entre las dos líneas de alfalfa.
- Tabla 16. Comparación de proteínas de tejido embriogénico y no embriogénico en diferentes especies.

1.- ANTECEDENTES

1.1) Cultivo de tejidos vegetales.

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica que consiste en sembrar in vitro en forma aséptica ápices de raíces y de tallos, primordios de hojas y flores, frutos inmaduros, órganos aislados, embriones maduros e inmaduros, segmentos de tallo y hojas, así como óvulos, anteras, polen, protoplastos y aún plantas completas en medios nutritivos adecuados y bajo condiciones ambientales controladas (Street, 1977).

Entre las áreas principales de investigación en las cuales repercute esta técnica se puede mencionar:

- a) Multiplicación vegetativa.
- b) Preservación de germoplasma.
- c) Mejoramiento genético.
- d) Recuperación de plantas amenazadas de extinción.
- e) Fusión de protoplastos (fitomejoramiento), y
- f) Producción de metabolitos de interés comercial.

Esta técnica esta basada en la totipotencialidad de las células vegetales, es decir, una célula de un organismo multicelular posee todas las instrucciones e información necesaria para desarrollar un organismo completo multicelular.

Existen dos vías para la regeneración de plantas a través de la técnica de cultivo de tejidos vegetales:

- a) Organogénesis.
- b) Embriogénesis.

1.1.1) Organogénesis.

La organogénesis consiste en la obtención de un meristemo apical (estructura unipolar), el cual generalmente muestra conexión vascular con la planta madre o el callo¹. Esta vía de propagación puede ser directa y denominarse organogénesis directa (sin pasar por la etapa del callo) o puede llevarse a cabo por una vía indirecta, organogénesis indirecta (pasando por la etapa del callo).

1.1.2) Embriogénesis.

La embriogénesis somática consiste en la formación de una estructura bipolar (meristemo apical y radicular), que no muestra conexión con el tejido madre que dará origen a la planta completa.

Al igual que la organogénesis, la embriogénesis somática puede llevarse a cabo tanto de manera directa como indirecta.

La embriogénesis presenta mayores ventajas que la organogénesis, algunas son: la presencia de dos meristemas, uno apical y el otro radicular en una sola estructura, la obtención de un gran número de embriones, la posibilidad de encapsulamiento y la formación de semillas artificiales. Además el embrión somático proporciona un sistema de análisis de los eventos tanto bioquímicos como moleculares que ocurren durante la inducción y maduración del embrión cigótico (Ammirato, 1987).

¹ Se puede definir el callo como un tejido obtenido por medio del aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, los cuales posteriormente son llevados a una dediferenciación celular, presentan de estas células una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada, que da origen a una masa amorfa de tejido. Esta masa celular puede presentar diferentes tipos morfológicos, los cuales varían según su apariencia, textura y composición celular (Barba, 1987).

Sin embargo, no obstante las ventajas que presenta la embriogénesis in vitro, ésta se restringe a un número pequeño de especies tomando mayor relevancia si se menciona que las familias vegetales más importantes agrónomicamente, como es el caso de las gramíneas y las leguminosas, son muy difíciles de ser regeneradas in vitro.

Se conoce de manera general, que son tres los factores químicos que intervienen en la regeneración de embriones somáticos: el tipo y la concentración de la auxina utilizada, la concentración de citocinina exógena y el nivel de nitrógeno total, que es una combinación de nitrato y amonio.

1.2) Embriogénesis somática en alfalfa.

La alfalfa es una especie que se ha regenerado por cultivo de tejidos vegetales. Hasta la década de los 80's su vía de propagación fue la organogénesis somática, posteriormente se ha desarrollado y perfeccionado su propagación vía embriogénesis somática.

Los embriones somáticos de alfalfa pueden regenerarse de una variedad de inóculos que pueden incluir embriones inmaduros, estambres, cotiledones, hipocotilo, hojas, tallos y pecíolos (Villegas, 1986).

La capacidad embriogénica de la alfalfa ha mostrado ser genotipo dependiente, es decir, mientras mayor contribución genética posea la variedad con la que se va a trabajar de Medicago falcata habrá mayor éxito en la respuesta in vitro, en tanto que mientras mayor contribución genética presente de Medicago sativa la regeneración de los embriones somáticos será escasa o nula.

La alfalfa Medicago sativa L. variedad Reagenlander fue selec-

p4

cionada por un estudio realizado por Atanassov y Brown (1984) probando 76 variedades comerciales, la mejor respuesta fue de un 80% en la variedad Reangelander. También se demostró que el inóculo con el que se obtiene el mayor rendimiento es el peciolo.

La obtención de embriones somáticos de alfalfa se lleva a cabo en tres etapas principales: inducción, desarrollo y germinación o como algunos autores prefieren llamarla, conversión² de los embriones somáticos. Este proceso se lleva a cabo alrededor de 42 días (Peña, 1988).

Las bases bioquímicas y moleculares del proceso de embriogénesis somática están poco entendidas (Sung et al., 1984; Stirn y Jacobsen, 1987; Ramagopal, 1989), no obstante, el sistema de embriogénesis in vitro de alfalfa presenta características que pueden ser utilizadas en el estudio de dicho proceso, éstas son:

- a) Altos niveles de reproducibilidad en su respuesta in vitro.
- b) Altos niveles de rendimiento en su producción de embriones somáticos y en relativamente poco tiempo.
- c) Los embriones pueden ser removidos para estudios a nivel bioquímico y morfológico.
- d) La respuesta genotipo dependiente de la alfalfa nos permite realizar estudios sobre diferenciación colocando a las plantas en estudio bajo las mismas condiciones.

Además, el sistema de embriogénesis in vitro de alfalfa puede extrapolarse a el estudio de otras leguminosas como son: frijol, chícharo, soya, lenteja, etc., que se han caracterizado por ser recalcitantes.

²Conversión.- Se utiliza este término para diferenciarlo del desarrollo de la plántula después de un estado de desarrollo de latencia, lo cual no ocurre con los embriones somáticos (Villegas, 1986).

1.3) Importancia de la alfalfa.

La alfalfa es una leguminosa que muchos investigadores consideran como la mejor forrajera del mundo, utilizándose principalmente como forraje verde o en forma de heno, y en algunas ocasiones como componente importante de alimentos concentrados.

La importancia de la alfalfa radica tanto en la calidad como en la cantidad del forraje obtenido, además de presentar asociación simbiótica con bacterias del género Rizobium sp. que tienen la facultad de fijar nitrógeno y producir nitrificación de los suelos.

La alfalfa supera en mucho a otras especies forrajeras, su proteína es de buena calidad, además de ser una fuente excelente de calcio, magnesio, fósforo, vitaminas A y D.

La harina de alfalfa se utiliza en mezclas comerciales como alimento pecuario, se producen anualmente más de un millón de toneladas de harina de alfalfa. Esta puede obtenerse de hojas, de tallo y de la planta completa, que contienen 21.2%, 11.5% y 18.9% de proteína respectivamente (Hughies, 1987).

1.3.1) Importancia de la alfalfa en México.

La alfalfa Medicago sativa, en México como en otros muchos países, es el cultivo forrajero más importante para la alimentación de rumiantes, en las zonas templadas, áridas y semiáridas en las cuales su cultivo es bajo condiciones de riego.

La superficie sembrada en México con alfalfa para 1981 fue de 143,356 hectáreas, siendo 20 los estados productores, destacando Chihuahua, Guanajuato, Hidalgo y Puebla como los mejores productores (VI Censo agrícola, ganadero y ejidal I.N.E.G.I., 1981).

Para el año de 1983 se incrementó la superficie sembrada con esta forrajera, más de 250,000 hectáreas; destacando los estados presentados en la Tabla 1.

Las variedades que han producido los mejores rendimientos son aquéllas que durante la época de frío no son afectadas en su desarrollo. Para los valles altos se recomienda las variedades siguientes: Transverde, Tanhuato, Apaseo, Atlixco, Valenciana, Caliverde, Moapa, Oaxaca, Arizona chilena, Velluda peruana y Africana (Canizales, 1966). Para el centro de Guanajuato las que han tenido mayor capacidad de rendimiento son: Puebla 76, Inia 76, Bajío 76, San Miguelito NK819, Moapa, Matador, Inia y Tanhuato (Guía para la asistencia técnica agrícola S.A.R.H.-I.N.A., 1985).

De las variedades mencionadas una es de especial interés para el presente estudio, la variedad Moapa. Esta es una alfalfa perenne cuya época de siembra va del primero de octubre al 30 de noviembre con una densidad de siembra de 25-30 Kg/ha (Dirección general de producción y extensión agrícola, Banco Nacional de Crédito Rural, S.A., S.A.R.H., 1980).

La variedad Moapa fue recomendada y cultivada en 10 de los 22 estados productores de alfalfa: Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Nuevo León, Oaxaca, Puebla y San Luis Potosí en el año de 1982 (S.A.R.H., 1981-1982).

Tabla 1. PRODUCCION DE ALFALFA VERDE COSECHADA EN MEXICO EN 1983

Estado	Superficie de riego	Temporal	Total	Tons/ha	Total (Tons)	Valor miles \$
Ags.	23,044	15,845	38,889	5.16	1,27513	2,825390
B.C.	25,971	13,745	39,716	7.15	1,079600	2,338800
B.C.S.	21,142	10,240	31,382	4.791	999470	1,998410
Coah.	18,144	11,745	29,889	4.881	1,120424	2,461270
Chih.	29,997	17,894	47,841	11.416	3,357300	7,072800
Dgo.	19,064	11,064	30,128	3.996	978058	1,439889
Gto.	22,775	12,354	35,129	9.133	3,176807	6,500421
Hgo.	21,094	15,600	36,694	5.714	1,000109	2,100308
Méx.	16,144	9,845	25,989	4.996	1,499000	2,597000
Qro.	22,775	12,715	35,490	3.027	473550	824064
Tlax.	22,891	5,785	28,676	2.528	301610	707357
Total	243,041	-	379,823	62.792	15261058	30,865709

(Información agropecuaria y forestal, S.A.R.H.- D.G.R.A., 1983)

1.3.2) Origen y evolución.

La alfalfa proviene del cercano oriente y centro de Asia según Bolton y Baenziger (1972). Medicago sativa L. tuvo su origen en el cercano oriente central, zona integrada por Asia menor, Transcaucasia, Irán y la región montañosa de Turkestán. Irán constituye el centro geográfico que más comúnmente se cita como centro de origen de la alfalfa.

La especie Medicago falcata L. es de flor amarilla, tolerante al frío, presentando un área de adaptación que se extiende hacia el norte de Siberia y en la región de Eurasia de clima similar. Esta

especie jugó un papel importante en la evolución de la alfalfa común (Medicago sativa).

Las características más importantes que transmitió el germoplasma de M. falcata fueron la resistencia al frío, a la sequía y a las enfermedades, así como raíces rastreras o rizomas.

En la actualidad las variedades de alfalfa son resultado del mantenimiento de una abundante variabilidad genética mediante polinización cruzada y entrecruzamiento de especies del complejo M. sativa-M. falcata, dando el híbrido M. media que originó una variedad de alfalfa de utilidad como las del tipo alemán y francés, y a ellas se debió la gran expansión del cultivo en el norte de Europa y en América del Norte (García, de los Santos 1987).

Esta gran variabilidad en las alfalfas actuales tiene gran relevancia al ser cultivadas in vitro, ya que la alfalfa presenta una respuesta genotipo dependiente.

1.3.3) Clasificación y descripción botánica.

1.3.3.1) Taxonomía.

La alfalfa pertenece a la familia Leguminosae, subfamilia Papilionoideae, tribu Trifolaceae, género Medicago y especie sativa

En relación a la taxonomía del género Medicago, Lesins y Guillies realizaron una revisión muy extensa y mencionan la existencia de cerca de 100 especies. Sin embargo, sólo existen 3 especies básicas que se consideran importantes, dentro de las cuales se encuentra la mayoría de las formas perennes que se cultivan para forraje, éstas son: sativa, glutinosa y falcata. Las dos primeras se presentan como tetraploides con número cromosómico $2n=32$ y falcata como diploide y tetraploide con $2n=16$ y 32 respectivamente (García de los Santos, 1987).

1.3.3.2) Morfología de la planta.

(Barnes, et. al, 1972).

La alfalfa es perenne con raíces abundantes y profundas. Posee una raíz principal, pivotante y con gran cantidad de raíces secundarias. En la especie M. sativa la raíz principal es muy marcada y puede llegar hasta la capa freática o roca madre a grandes profundidades. La especie M. falcata, en cambio, presenta una raíz de tipo fasciculado, mucho más superficial.

Las primeras hojas verdaderas después de los cotiledones son unifoliadas. Posteriormente, las hojas normales son trifoliadas y pecioladas. Los folíolos adoptan distintas formas siendo más o menos oblongos y anchos.

Las flores van reunidas en racimos axilares de distinto tamaño y densidad. La primera inflorescencia se encuentra frecuentemente a la altura del nudo catorce. La coloración es violeta con distintas tonalidades que van del azul pálido al morado oscuro. Sin embargo, la especie M. falcata tiene flores de color amarillo y los híbridos entre ambas especies son de flores variadas, que suelen ser violetas cuando aún están en capullo, verdes al abrirse y amarillas o casi blancas al madurar.

En cuanto a su conformación, posee un gran estandarte con dos alas mayores que la quilla. Los estambres son diadelfos y forman por un lado un paquete de nueve estambres, reunidos en un tubo estaminal que envuelve al estilo y al estigma. Las alas poseen a ambos lados, una especie de ganchos que obligan al conjunto de estambres y pistilos a permanecer dentro de la quilla.

El fruto maduro de M. sativa es una vaina enrollada en espiral

de 3 a 5 vueltas e indehisciente, mientras que en *M. falcata* por el contrario, son generalmente derechos o en forma de media luna y dehiscente. En las poblaciones híbridas existen graduaciones en cuanto a la forma de la vaina y la dehiscencia. La vaina tiene varios grados de pubescencias y posee tres regiones bien distinguibles: epicarpio, exocarpio y endocarpio.

La semilla madura tiene 2.5 mm de largo, 1.5 mm de ancho y 1.1 mm de espesor, son de color amarillo brillante o verde olivo a marrón. La semilla está compuesta por dos cotiledones, una radícula un epicotilo en el cual están las primeras hojas, el endospermo, que es de un cuarto a un medio del volumen del embrión, una cubierta seminal coloreada, con un hilo ubicado centralmente (Rojas, 1991).

1.4) Diferenciación celular.

Uno de los mayores problemas en la biología, aún sin resolver es el cómo se llevan a cabo los complejos mecanismos de la diferenciación celular.

El término diferenciación tradicionalmente se ha definido como el proceso por el cual las células de un organismo multicelular llegan a ser tanto funcional como estructuralmente diferentes durante la ontogenia. También podemos considerar que una célula es diferenciada con respecto a otra si ambas presentan el mismo genoma, pero presentan diferentes fenotipos (Villegas, 1991).

La capacidad que presentan algunas células vegetales (somáticas) para inducir³ la formación de embriones (fenómeno conocido como embriogénesis somática) en respuesta a un estímulo adecuado, es un proceso bien establecido en algunas especies vegetales como es el caso de *Daucus carota*.

Esta capacidad de regenerar embriones *in vitro* no se ha logrado en todas las especies vegetales, destacando las gramíneas y las leguminosas.

La obtención de una planta completa a partir de células somáticas se puede llevar tanto de manera directa como indirecta.

En la vía directa células indeterminadas se encuentran presentes en el inóculo y requieren sólo de una pequeña etapa de proliferación y la inducción de su determinación hacia la estructura deseada.

Por la vía indirecta la obtención de una planta completa a través de células somáticas involucra dos fases claves: desdiferenciación y rediferenciación (Ramogopal, 1989).

La desdiferenciación involucra dos distintos tipos de cambios

- A) La reactivación de la división celular en las células maduras y
- B) El modificar cualquier metabolismo o desarrollo especializado, que pudo haber adquirido la célula (Wearing y Al-Chalabi 1985).

El proceso de desdiferenciación tiene como una de sus funciones la obtención de células competentes. Este concepto fué introducido por Halperin en 1967 (Street, 1977) como la capacidad de una célula vegetal para expresar su inherente totipotencia; también podemos aplicar el término competencia a una o a un grupo de células que están en un estado fisiológico tal que con un estímulo adecuado puede(n) tomar diferentes rutas morfogénicas. Sin embargo, no todas las células desdiferenciadas son competentes. Esto podemos observarlo con mayor claridad en la Figura 1.

³Inóculo.- En un sentido amplio, se entiende como un cambio en el destino de la célula o de un grupo de células (Villegas, 1991).

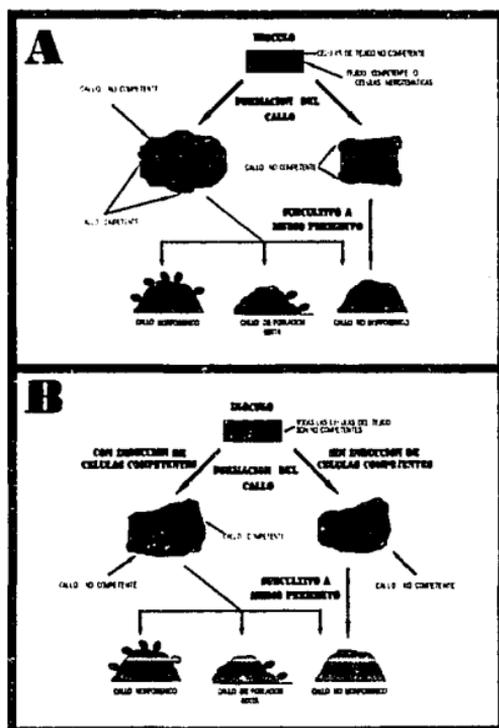


FIGURA 1. Representación esquemática de las expresiones morfológicas en células competentes (A) y no competentes (B) de un inóculo cultivado. (Street, 1977).

Las células en un estado competente presentan la posibilidad de rediferenciarlas, es decir, comprometerlas a una nueva ruta de especialización (fenómeno conocido como determinación).

La competencia es un prerrequisito para que ocurra la determinación específica, es muy difícil separa estos dos procesos, ya que en un sistema celular podemos encontrar ambos estados fisiológicos lo que plantea la necesidad de caracterizarlos mediante marcadores bioquímicos. También es preciso aclarar que en algunas ocasiones un grupo de células puede encontrarse competente para una cierta determinación preferencial sobre otras.

1.4.1) Bases de la diferenciación celular.

Los estudios enfocados a comprender las bases de la diferenciación celular están más estudiados en animales. Las hipótesis en caminadas a explicar estos mecanismos en células animales no pueden aplicarse a células vegetales, ya que existen marcadas diferencias entre estos dos reinos.

Para el caso de los vegetales el cultivo de tejidos vegetales ofrece una herramienta para poder estudiar los mecanismos de la diferenciación celular. Se conoce que las células vegetales tienen la habilidad de inducir la formación de embriones somáticos bajo un estímulo adecuado (como puede ser un apropiado balance de reguladores de crecimiento adicionados al medio de cultivo) que las hace competentes, para dirigirse a nuevas rutas morfogénicas. Sin embargo se conoce muy poco acerca de los mecanismos bioquímicos y moleculares que inducen competencia, lo que hace al cultivo de tejidos vegetales una técnica de ensayo y error.

El por qué algunas especies vegetales poseen gran plasticidad para la formación de embriones y otras especies la tienen tan limitada dicha plasticidad es una pregunta que aún no tiene respuesta ya que son muy complejos los mecanismos involucrados en la diferenciación celular.

La diferenciación involucra la expresión selectiva del material genético, los genes adecuados deben ser expresados en los tiempos adecuados. Además de esta expresión genética existen otros mecanismos que pueden influir en la expresión morfogénica. Estos mecanismos pueden ser tanto de carácter bioquímico como cambios en los patrones de proteínas y/o enzimas, así como factores de tipo biofísico, entre los que podemos mencionar orientación en la división celular, y físicos como campos eléctricos, potencial hídrico, gradientes de auxinas, luz y gradientes de iones (Villegas, 1991).

El tratar de formular una hipótesis que englobe todos estos mecanismos sería sumamente complejo, ya que se tendría que ir de un nivel general hasta niveles particulares muy específicos, es decir, iniciando en la expresión fenotípica y terminando en el gene mismo, en donde todos los pasos intermedios estuvieran bien caracterizados y definidos (Villegas, 1986).

1.4.2) Proteínas involucradas en la diferenciación celular.

Las proteínas presentes en los embriones en desarrollo son de dos tipos (Danielson, 1976): proteínas metabólicas que pueden ser enzimáticas o estructurales relacionadas con las actividades normales de la célula, incluyendo la síntesis de proteínas del segundo tipo: proteínas de reserva, estas proteínas junto con las reservas de carbohidratos y de lípidos se sintetizan durante el desarrollo

de la semilla.

Existe una serie de trabajos enfocados al estudio de las proteínas de reserva tanto en embriones cigóticos como en embriones somáticos. Las proteínas de reserva del tipo de las globulinas en la familia de las leguminosas están bien caracterizadas como 7S (7-9S) y 11S (10-14S) denominadas de acuerdo con su coeficiente de sedimentación en gradiente de sacarosa (Stuart y Nelsen 1988). Estas proteínas son un sistema de estudio muy atractivo, ya que, son sintetizadas en poco tiempo durante el desarrollo de la semilla se acumulan en grandes cantidades y son específicas del estado embrionario.

Las proteínas del tipo metabólico han sido objeto de estudio en algunos sistemas de embriogénesis somática bien establecidos. Estas proteínas a comparación de las de reserva no están bien caracterizadas y se les ha relacionado con los procesos de diferenciación celular (Ramagopal, 1989).

Entre los trabajos realizados con las proteínas involucradas en la diferenciación celular podemos mencionar el llevado a cabo en zanahoria por Sung y Okimoto (1981) en donde se encontraron dos proteínas "embrionarias" que denominaron E1 y E2. Estas proteínas fueron sintetizadas en respuesta al cambio a medio fresco. Su aparición y desaparición ocurre siempre antes de la formación de los embriones y podrían jugar un papel regulatorio o estructural.

En 1987, Stirn y Jacobsen trabajaron con dos genotipos de chícharo (*Pisum sativum*). Ambos genotipos muestran la formación de dos líneas de callo. Una línea es nodular y amarillenta y tiene la capacidad de regenerar embriones somáticos, mientras que la otra línea de callo es compacta y de color blanquecino sin capacidad de

regenerar embriones somáticos. Se encontraron dos bandas de proteínas (P₁: peso molecular de 45,000 daltones, pI 7.0-7.1; P₂: peso molecular 70,000 daltones, pI 4.5), las cuales fueron características de la línea de callo embriogénico en todos los genotipos y tejidos investigados. Además estas proteínas encontradas en chícharo son muy semejantes a las reportadas por Sung & Okimoto.

Lian & Luthe (1987), al trabajar con *Oryza sativa* L. observaron que esta especie también forma dos tipos de callo (embriogénico y no embriogénico). En los extractos de proteínas de embriones y de callos embriogénicos y no embriogénicos encontraron diferencias tanto cualitativas como cuantitativas.

Varios polipéptidos en un rango de 40-44kD fueron más abundantes en los extractos de embriones de arroz y de callo embriogénico comparados con los extractos de callos no embriogénicos. Otro polipéptido de 22.7kD fue más abundante en callo no embriogénico. Estos polipéptidos pueden tener su contraparte en el sistema de cultivo en suspensión de zanahoria (Sung & Okimoto, 1981); en donde el polipéptido embriogénico tiene un peso molecular de 43 kD y el polipéptido presente en tejido no embriogénico es de 24 kD.

En otro trabajo realizado en cebada (*Hordeum vulgare* y *Hordeum bulbosum*) por Ramogopal (1989), se monitorearon los cambios de proteínas durante la diferenciación de embriones y raíces. Las proteínas "específicas de la diferenciación" encontradas en los embriones derivados de callo y las raíces derivadas de callo presentaron idénticas propiedades electroforéticas. Treinta y dos proteínas fueron asociadas a la diferenciación celular, las cuales son agrupadas en tres grupos principales:

a) Un grupo constituido por 15 proteínas que aparecen durante la

formación del callo primario, fueron expresadas en todas las líneas celulares establecidas;

b) Otro formado por 9 proteínas que aparecen únicamente durante el crecimiento del callo primario en las líneas celulares establecidas, y

c) un último grupo constituido por 8 proteínas que aparecen tanto en el callo primario como en el establecimiento de la línea celular cuya síntesis fue aparentemente dependiente del genotipo de la especie.

Varias de estas proteínas pueden ser candidatas para el estudio de la biología molecular en la diferenciación y el desarrollo celular en cebada.

El sistema de embriogénesis somático en alfalfa también tiene la capacidad de crecer dos tipos de callos (embriogénico y no embriogénico), como se mencionó anteriormente este sistema es genotipo dependiente.

En el presente estudio se trabajó con dos líneas de alfalfa:

a) La alfalfa Medicago sativa L. var. Reangenlander línea A70.34, que es embriogénica y cuyo protocolo de embriogénesis somática está bien establecido, y

b) Una variedad mexicana Medicago sativa (variedad Moapa) que no presenta la capacidad de regenerar embriones somáticos in vitro pero que es de gran importancia agronómica, ya que en nuestro país es una de las variedades más cultivadas.

1.5) Caracterización de proteínas en geles de SDS-PAGE

La electroforesis es el movimiento de partículas cargadas en una solución bajo la influencia de un campo eléctrico. La migración

de partículas cargadas puede llevarse a cabo empleando diversos soportes como papel de acetato de nitrocelulosa o poliacrilamida (Hames, 1981).

La electroforesis en gel de poliacrilamida es un método capaz de separar moléculas en base a su carga neta (Chrambach y Rodbard, 1981). Las características principales de este gel es que tiene un gran poder de resolución, es químicamente inerte, estable en un amplio rango de pH y de temperaturas, es transparente y fácil de manipular.

El gel de poliacrilamida resulta de la polimerización de monómeros de acrilamida dentro de largas cadenas y la unión cruzada de compuestos bifuncionales como N,N-metileno bisacrilamida (usualmente abreviado como bisacrilamida).

La polimerización es iniciada por la adición de persulfato de amonio y riboflavina (TEMED), que son agregados como catalizadores del proceso de polimerización (Hames, 1981).

La medida del poro en geles de poliacrilamida está influenciada por la concentración total de acrilamida de la mezcla de polimerización, es decir, la medida del poro disminuye cuando la concentración de acrilamida aumenta. Esto resulta ser muy ventajoso, ya que de acuerdo a las mezclas que se deseen separar podrá elegirse la estructura molecular del gel aumentando o disminuyendo su poro de filtración.

Para la separación de proteínas en geles de poliacrilamida se utilizan sustancias diseñadas para disociar todas las proteínas en subunidades individuales de polipéptidos. El agente más comúnmente utilizado es el detergente iónico, dodecil sulfato de sodio (SDS). La mezcla de proteínas es desnaturizada al hervirla (100 °C) en

presencia de SDS y de agentes reductores como β -mercaptoetanol. La unión de los polipéptidos con SDS proporciona una carga negativa uniforme que les permite migrar a través del gel de poliacrilamida. La movilidad es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular.

Para conocer los pesos moleculares de los polipéptidos que constituyen la muestra problema, puede llevarse a cabo por comparación con marcadores de peso molecular conocido que corren bajo las mismas condiciones electroforéticas.

Para tener una máxima resolución las muestras son colocadas en carriles separados con ayuda de un peine para separar las trayectorias en el gel concentrador, lo que crea una frontera acumulando a las proteínas en una estrecha zona antes de entrar al gel de corrida ó separador.

1.6) Análisis densitométrico de los geles teñidos con azul de Coomassie.

Existen una serie de técnicas de tinción para visualizar las bandas presentes después de realizada la electroforésis. La sensibilidad de cada una de ellas depende de las propiedades de las proteínas separadas (Shin y Ruoho, 1981).

La tinción con azul de Coomassie es un método muy sensible con el que pueden visualizarse sin problemas polipéptidos en una cantidad que varía de 0.5 a 1 μ g. El azul de Coomassie es un colorante no polar, usualmente mezclado con solución de metanol y ácido acético glacial para que la fijación y el teñido de las bandas ocurra simultáneamente.

El desteñido de los geles (para tener una definición clara de

las bandas) se lleva a cabo por difusión empleando una solución que contenga isopropanol y ácido acético. Para un desteñido más rápido puede utilizarse una mezcla de metanol y ácido acético, teniendo cuidado de que las bandas no sean desteñidas (HAMES, 1981).

El análisis de los geles puede llevarse a cabo por espectrofotómetros adaptados para realizar un scanning. Este análisis por densitómetros puede realizarse utilizando el gel fresco que es colocado en la celda para realizar las lecturas u obteniendo un acetato del gel que se coloca de igual forma que el gel fresco, pero con la gran ventaja de que el gel fresco se conserva.

La mayoría de los aparatos mueven al gel a una velocidad constante perpendicular al rayo de luz (550 nm), el cual es detectado por un fotomultiplicador.

Algunos densitómetros tienen incorporados integradores automáticos que permiten conocer el área bajo cada pico, por lo cual, la cantidad relativa de un componente simple en diferentes geles puede ser estimado.

2.- JUSTIFICACION

El cultivo de tejidos vegetales como parte de la biotecnología vegetal, es una técnica con la que se pueden tener beneficios a corto, mediano y largo plazo y nos ofrece la posibilidad de clonar plantas con características deseables bajo condiciones ambientales controladas y a un plazo menor que las técnicas tradicionales.

Esta técnica no trata de reemplazar a las técnicas tradicionales sino de servir como apoyo para la obtención de variedades mejoradas (calidad de las semillas, resistencia a plagas y enfermedades, etc.). Sin embargo, el cultivo de tejidos vegetales presenta

limitaciones, ya que es una técnica de ensayo y error. En el caso de las familias con mayor importancia agronómica, como las leguminosas y las gramíneas no han podido ser regeneradas por esta técnica.

Tanto los complejos mecanismos de diferenciación celular, así como aquéllos que inducen competencia para que una célula pueda tomar diferentes rutas morfogénicas no han sido bien entendidos, y mientras éstos no sean comprendidos y estudiados representaran una de las grandes limitaciones de esta técnica.

Como consecuencia de lo anterior, es necesario realizar estudios integrales que abarquen desde la expresión fenotípica de las células hasta llegar a un nivel genético, en donde todos los pasos intermedios estén bien caracterizados.

Por lo anteriormente expuesto es necesario llevar a cabo estudios que contribuyan al conocimiento de los mecanismos de diferenciación celular en plantas, como es el caso de proteínas presentes o ausentes en callos embriogénicos y no embriogénicos de alfalfa.

II.- OBJETIVOS

2.1) General:

Determinar y analizar las diferencias existentes entre los patrones de proteínas de las líneas embriogénicas y no embriogénicas de alfalfa durante la fase de inducción del proceso de embriogénesis somática.

2.2) Particulares:

Obtener una línea celular no embriogénica de Medicago sativa variedad Moapa.

Establecer los cambios que ocurren durante el período de inducción en la concentración de proteínas en la línea embriogénica y no embriogénica.

Determinar las diferencias en el patrón de bandeo y la concentración de proteínas que se presentan entre las dos líneas.

III.- HIPOTESIS

Si la respuesta del proceso de embriogénesis somática es genotipo dependiente entonces los patrones de bandeo de proteínas de líneas embriogénicas y no embriogénicas serán diferentes.

IV.- MATERIALES Y METODOS

4.1) Material biológico.

El material biológico para el presente estudio fueron plantas de alfalfa Medicago sativa L. variedad Reagenlander línea A70.34 y Medicago falcata variedad F.1.1 (proporcionadas por el Canadian Plant Research Center of Agriculture), además de semillas de M. sativa variedad Moapa adquiridas comercialmente.

4.2) Establecimiento del cultivo aséptico.

4.2.1) Preparación de medios de cultivo.

Los medios de cultivo utilizados para el presente trabajo fueron MS (Murashige & Skoog, 1962), MS modificado (en contenido de nitrógeno, Meijer & Brown, 1987) y B₅ (Villegas, 1991, modificado de Gamborg, et al, 1968). La composición de los medios se indica en el Apéndice 1.

El estado físico de los medios fué de gel sólido, adicionando para ello agar Bioxón fundido (9 g/l). Para el caso del MS y del MS modificado el pH se ajustó a 5.8 ± 0.1 y el B₅ se ajustó a 5.5 ± 0.1 N con hidróxido de sodio y/ó ácido clorhídrico 0.1 N, y su esterilización se realizó a 20lb/pulg² de presión y 121°C de temperatura durante 30 minutos.

4.2.2) Desinfestación del material biológico.

La esterilización superficial consistió para el caso de pecíolos, en colocarlos primeramente al chorro del agua por 15 minutos, en seguida se sumergieron en una solución de hipoclorito de calcio

al 4% (p/v) por 6 minutos, con agitación constante; posteriormente se realizaron tres lavados con agua destilada estéril. Los pecíolos ya desinfectados se sembraron en frascos de vidrio con 9 ml de medio de cultivo, colocando de 4 a 5 fragmentos por frasco de 5 a 7mm de longitud aproximadamente.

Para el caso de internodos (línea A70.34) se colocaron en agua jabonosa diluída (3%) por 15 minutos, se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 30% (v/v) (1.8% de cloro activo) por 20 minutos agitando constantemente; posteriormente se llevaron a cabo tres enjuagues con agua destilada estéril y se procedió a su siembra en frascos o macetas de 70 x 70 x 100 mm con 20 ml y 50 ml de medio respectivamente. El medio de cultivo para internodos fue MS al 50% suplementado con 15 g/l de sacarosa y 8 g/l de agar (Bioxón), colocando en cada recipiente de cultivo cuatro internodos de 1.5 a 2.0 cm cada uno.

La desinfección superficial en el caso de semillas de la variedad Moapa consistió en colocarlas en etanol al 70% por 1 ó 2 minutos, posteriormente se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 30% (v/v) (con agitación constante) por 6 minutos, inmediatamente después se realizaron tres lavados con agua destilada estéril y se dejaron por 24 horas en agua estéril (esto último con la finalidad de acelerar la germinación).

La siembra se llevó a cabo en frascos de vidrio conteniendo el mismo medio de cultivo empleado para internodos, sembrándose un total de 10 a 15 semillas por frasco de cultivo. En el caso de la alfalfa variedad F.1.1 ya se tenía en condiciones asépticas.

4.2.3) Condiciones de incubación.

La incubación de los cultivos se llevó a cabo bajo un fotoperíodo luz-oscuridad de 16/8 hrs., a una temperatura de $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$. La intensidad luminosa fue de 350 lux, dada por lámparas de luz fría colocadas a 30 cm de distancia de los frascos de cultivo.

4.3) Protocolo de embriogénesis somática de A70.34 y Moapa.

El protocolo de embriogénesis somática se divide en tres etapas, de acuerdo al Diagrama 1.

Para la línea A70.34 el medio de inducción fue B₅ suplementado con 1 mg/l de adenina, 0.2 mg/l de cinetina 1 mg/l de 2,4-D y 9 g/l de agar (Bioxón).

En el caso de la línea F.1.1, el medio de inducción fue MS suplementado con 5 mg/l de 2,4-D, 1 mg/l de cinetina y 8 g/l de agar

Los medios de desarrollo para cada línea, fueron los mismos de inducción, pero sin los reguladores de crecimiento, y agregando 1.75 g/l de casaminoácidos (Peña, 1988).

La germinación de embriones se llevó a cabo en MS al 50% suplementado con 8 g/l de agar.

En cada protocolo se procedió a evaluar los siguientes parámetros:

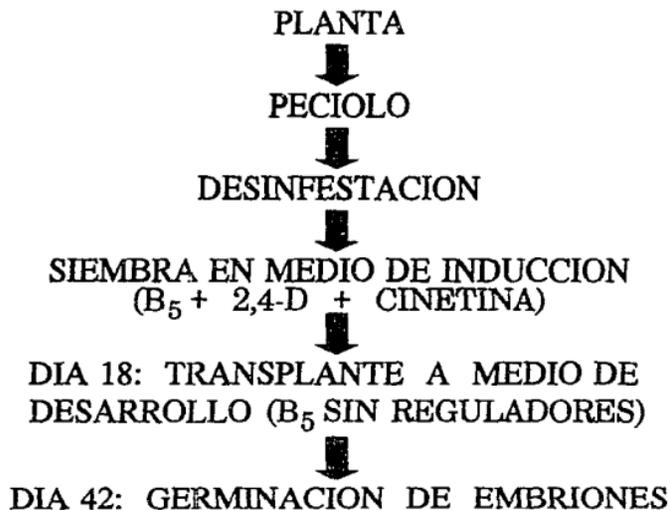
- Respuesta= # de callos con embriones/ # de callos totales x 100;
- Rendimiento= # de embriones totales/ # de callos con embriones;
- Eficiencia= respuesta x rendimiento

4.4) Selección del germoplasma no embriogénico de la variedad Moapa.

Para tener una selección correcta del material no embriogénico

DIAGRAMA 1

PROTOCOLO DE EMBRIOGENESIS SOMATICA



de Moapa, se sometieron 100 plantas al protocolo de embriogénesis somática de F.1.1.

Las plántulas obtenidas de semillas germinadas en condiciones asépticas, a las dos semanas de cultivo se transplantaron de manera individual a tubos de ensayo y se sembraron sus pecíolos en medio de inducción por 18 días, después de los cuales se pasaron a medio de desarrollo. La evaluación se realizó al día 42 de cultivo. Las plantas que resultaron no embriogénicas se transplantaron de in vitro a in vivo para utilizarse como fuente de pecíolo.

4.4.1) Transplante de in vitro a in vivo de la variedad Moapa.

Las plantas con un buen desarrollo de raíces se transplantaron a condiciones de invernadero de la manera siguiente:

Las raíces se lavaron perfectamente para retirar todo el agar y se colocaron en macetas con una mezcla de tierra-agrolita (1:1) previamente esterilizada en autoclave (20 lb/pulg² por 30 minutos).

Las macetas se cubrieron con bolsas de plástico, a las cuales se les hacía orificios cada semana para adaptar a las plantas a las condiciones ambientales.

4.5) Propagación del material vegetativo.

Para el presente estudio se requirieron grandes cantidades de material biológico, por lo que fue necesario su propagación, con el fin de tener un abastecimiento constante de pecíolos. Para conseguirlo se plantearon los siguientes experimentos:

- a) Enraizamiento de internodos de la línea F.1.1 (Tabla 2).
- b) Enraizamiento de internodos de la línea A70.34 (Tabla 3).

TABLA 2**ENRAIZAMIENTO DE INTERNODOS DE LA LINEA F.1.1.**

MEDIO	REGULADORES DE CRECIMIENTO			
	AIA	AG-3	ANA	CONT'
MS 50%	AIA	AG-3	ANA	CONT'
MS 100%	AIA	AG-3	ANA	CONT'

TABLA 3**ENRAIZAMIENTO DE INTERNODOS DE LA LINEA A70.34**

TRATAMIENTO	REGULADOR (mg/l)	SACAROSA (g/l)	
		15	30
A	AIB (0.02)	X	X
B	AIB (0.05)	X	X
C	AIB + ANA	X	X
D	-----	X	---

LOS EXPERIMENTOS SE REALIZARON EN LUZ Y OSCURIDAD, SIENDO EL RESULTADO EL SIGUIENTE:

En cada tratamiento se procedió a evaluar los parámetros siguientes:

- % de enraizamiento;
- # de pecíolos por explante;
- Estimación visual del estado de los pecíolos.

Además de los experimentos descritos, se llevó a cabo una propagación masiva de las dos líneas de alfalfa, siguiendo el protocolo respectivo de embriogénesis somática.

4.6) Manipulación para usar un solo protocolo de embriogénesis somática.

Con el propósito de determinar la posibilidad de utilizar un solo protocolo de embriogénesis somática, se planteó el experimento descrito en la Tabla 4.

Las tres líneas de alfalfa se sembraron de acuerdo a los cuatro tratamientos descritos, siendo los testigos los tratamientos A y D. La fase de inducción se realizó como se describió anteriormente; la de desarrollo, utilizando MS ó B₅ sin reguladores de crecimiento según correspondía. La evaluación se realizó el día 42 de cultivo.

4.7) Análisis de proteínas tempranas.

Con el objeto de tener marcadores bioquímicos de embriogénesis somática entre la línea embriogénica (A70.34) y la no embriogénica (Moapa), se seleccionaron a las proteínas que se sintetizan durante los primeros 18 días de cultivo (fase de inducción). A continuación se describen los procedimientos de extracción, cuantificación y caracterización de proteínas.

TABLA 4**PROTOCOLO DE EMBRIOGENESIS
SOMATICA**

TRATAMIENTO	MEDIO	REGULADORES (mg/l)	
		CINEFINA	2,4-D
A	B ₅	0.2	1.0
B	MS	0.2	1.0
C	B ₅	1.0	5.0
D	MS	1.0	5.0

4.7.1) Extracción de proteínas.

La fracción de proteínas extraídas de callos de A70.34 y Moapa de 18 días de cultivo consistió en albuminas. La fracción se extrajo con amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7 e inhibidores de proteasas (EDTA 100 μ M y PMSF 200 μ M).

El protocolo de extracción de proteínas se indica en el Diagrama 2, todo el proceso se llevó a cabo en frío (0-4 °C).

4.7.2) Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

4.7.2.1) Reactivo de Bradford.

Se pesaron 200 mg de azul de Coomassie G-250, se disolvieron en 100 ml de etanol al 96% con agitación constante, posteriormente se adicionó 200 ml de ácido fosfórico al 65 % y se aforó a 2 l con agua bidestilada. La solución se filtró en papel Wattman # 4 y se guardó en frasco ambar (Bradford, 1976).

4.7.2.2) Solución patrón de proteínas.

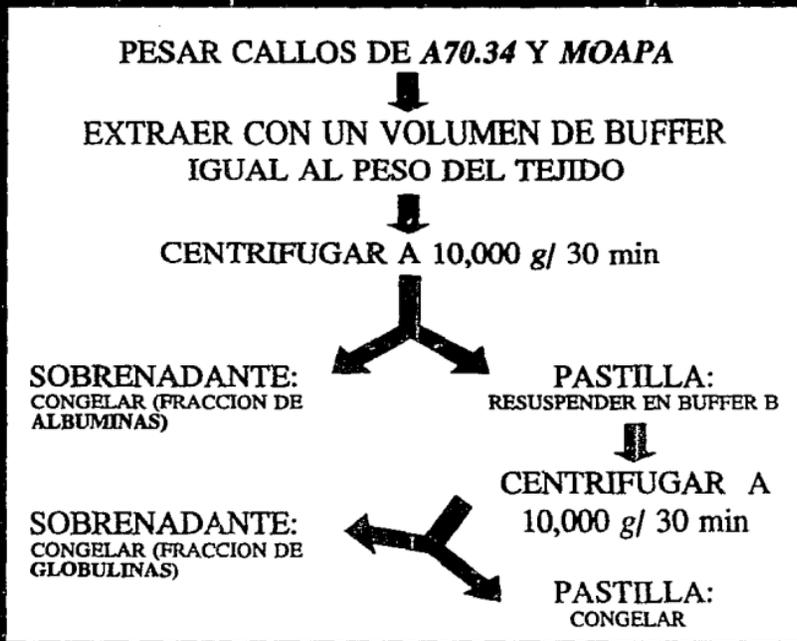
Se disolvieron 25 mg de albúmina sérica bovina (BSA) en 25 ml de solución de cloruro de sodio 0.15 M (concentración final de 1 mg por ml). La solución se congeló en fracciones de 1 ml en viales Eppendorf.

4.7.2.3) Obtención de la curva tipo.

La curva tipo se realizó tomando diferentes alícuotas de la solución patrón de proteínas, de acuerdo con el cuadro siguiente:

DIAGRAMA 2

PROTOCOLO DE EXTRACCION DE PROTEINAS



BSA ^a (μ l)	NaCl ^b (μ l)	FDC ^c	Conc. final de BSA (μ g/ml)
0	100	—	0
5	95	20	50
10	90	10	100
20	80	5	200
40	60	2.5	400
50	50	2	500

^aConcentración de BSA = 1 mg/ml

^bConcentración de NaCl = 0.15 M

^cFD = Factor de dilución

A cada muestra se le agregó 5 ml del reactivo de Bradford, se homogenizaron en un vortex y se les leyó su absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro. Finalmente la curva se ajustó por el método de mínimos cuadrados.

4.7.2.4) Cuantificación de proteínas.

A los extractos provenientes de los diferentes experimentos se les cuantificó su contenido de proteínas de la forma siguiente:

Se colocaron 10 μ l de cada muestra en un tubo de ensayo, se les adicionó 90 μ l de amortiguador de fosfatos, se agregaron 5 ml de reactivo de Bradford, se agitaron en un vortex y se les leyó su absorbancia en un espectrofotómetro a 595 nm. La concentración de proteínas de cada muestra se obtuvo por interpolación en la curva tipo.

4.7.3) Caracterización de proteínas por electroforesis en geles de SDS-PAGE.

Para realizar el seguimiento de las diferencias bioquímicas que existen entre callos embriogénicos y no embriogénicos de alfalfa, se utilizó la técnica de electroforesis en geles de SDS-PAGE, bajo condiciones desnaturalizantes, de acuerdo con Laemmli (1970).

Se empleó una cámara doble (82 X 74 mm) de electroforesis vertical^{B34} con un espesor de 1.5 mm para cada gel. Las soluciones utilizadas para la electroforesis se enlistan en el Apéndice 2.

4.7.3.1) Preparación del gel de corrida.

Los geles de corrida se prepararon al 10, 12 y 14 % (ver Apéndice 2). La mezcla de polímeros se vació en las placas de electroforesis, perfectamente limpias y montadas en el aparato, se dejó un espacio de aproximadamente 1 cm sin llenar para colocar posteriormente el gel concentrador. Para que el gel tuviera un frente homogéneo se le agregó unas gotas de SDS al 2 %. Una vez polimerizado el gel espaciador se retiró el SDS y se colocó un peine con un total de 10 carriles. El gel concentrador se preparó a una concentración del 5% (ver Apéndice 2).

4.7.3.2) Cargado y corrido de las muestras.

Una vez cuantificados los extractos de proteínas, se prepararon para la electroforesis: Las muestras se ajustaron a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. De cada muestra se preparó un volúmen total de 500 μl , tomando la cantidad necesaria de proteínas para tener 500 μg , más 125 μl de amortiguador de muestra y 25 μl de β -mercaptoetanol. Las muestras se agitaron en un vortex por 15 segundos, se colocaron en un baño de agua hirviendo por dos minutos, se agitaron nuevamente y se hirvieron por dos minutos más.

Las muestras ya preparadas se colocaron en los carriles con ayuda de una jeringa Hamilton en un volúmen de 10-20 μl .

Los marcadores de peso molecular fueron de BRL (Bethesda Research Laboratories) y se reconstituyeron en 500 μl de agua bidesti-

lada estéril. Para desnaturalizar las proteínas se colocaron 125 μ l de β -mercaptoetanol, se agitaron en un vortex y se colocaron en baño de agua hirviendo por 5 minutos. Los marcadores se cargaron en un volumen de 5 μ l para cada carril.

Los pesos moleculares de las proteínas utilizadas como marcadores se enlistan a continuación:

Proteína marcadora	Daltones
Miosina cadena-H	200,000
Fosforilasa b	97,000
Albúmina sérica bovina	68,000
Ovoalbúmina	43,000
Anhidrasa carbónica	29,000
β -Lactoglobulina	18,400
Lisozima	14,300

Se construyó una curva tipo graficando \log_{10} del peso molecular vs distancia a su banda correspondiente, medida a partir del gel separado. De la ecuación de la recta para cada gel, se determinó el peso molecular para cada proteína en el gel correspondiente mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Peso molecular} = \text{antilog}_{10} (b - mRf)$$

donde:

b = Ordenada al origen.

m = Pendiente de la recta.

Rf = Distancia recorrida en el gel por cada proteína (banda)/frente

En todos los casos, la duración de la corrida fue de aproximadamente de una hora y media a corriente constante de 150 voltios.

Pasado este tiempo, los geles se retiraron cuidadosamente de la cámara de electroforesis y se les marcó en el extremo inferior izquierdo, respecto al carril 1.

4.7.3.3) Teñido y desteñido de los geles.

Los geles se colocaron en recipientes individuales con solución fijadora-teñidora aproximadamente por dos horas. El desteñido de los geles se realizó retirando el colorante y colocándolos en la solución desteñidora, hasta obtener una buena definición de las bandas de proteínas.

4.8) Cinética de callos de A70.34 y Moapa.

Con el objeto de tener un seguimiento de la línea embriogénica y la no embriogénica y poder determinar los cambios de polipéptidos que ocurren durante los estados tempranos de inducción, como sucede en los callos embriogénicos y no embriogénicos de arroz (Lian y Luthé, 1987), se llevó a cabo una cinética de crecimiento de las líneas embriogénica (A70.34) y no embriogénica (Moapa), que abarcó la etapa de inducción del proceso de embriogénesis somática.

Se sembraron 120 frascos (60 para A70.34 y 60 para Moapa), cada uno de ellos con 4 fragmentos de pecíolos, en medio de inducción. La extracción de proteínas se llevó a cabo conforme a una cinética de cultivo; cada tercer día partiendo del cero hasta el 18.

En cada extracción los callos se cosecharon, se pesaron y se les cuantificó proteínas y posteriormente se procedió al corrimiento en geles de SDS-PAGE 10, 12 y 14%.

De este experimento se realizaron 5 repeticiones de manera independiente; de los mejores geles se efectuó un análisis densitográfico, realizando 20 lecturas/mm.

4.9) Prueba fisiológica.

Para observar si el extracto de callos embriogénicos pudiera tener algún efecto sobre la inducción de embriones somáticos en la

línea no embriogénica, se efectuó una prueba de cultivo colocando un extracto de 18 días de cultivo de la línea embriogénica de proteínas en el medio de inducción, en el cual se cultivó la línea no embriogénica.

Se sembraron 320 pecíolos de A70.34 en medio de inducción. A los 18 días de cultivo se procedió a la extracción de albúminas.

El extracto proteico se cuantificó y filtró en papel Wattman cuantitativo de diferentes poros. Se preparó medio de inducción con el extracto de callos de A70.34 en una proporción de 10-15 % v/v. Los pecíolos de la línea Moapa se sembraron en este medio y en medio de inducción normal como testigo.

A los 18 días de cultivo se evaluó y se realizó el trasplante a medio de desarrollo, realizándose la última evaluación el día 42 de cultivo.

5.1) Embriogénesis somática en A70.34 y Moapa.

La obtención de embriones somáticos a partir de pecíolos de plantas de alfalfa, es un proceso bien establecido, para el caso de la línea embriogénica A70.34. Esta presenta un alto índice de formación de embriones somáticos. Esto ha sido posible debido a la serie de cultivos realizados con la finalidad de seleccionar aquellas plantas con mayor respuesta y rendimiento, con la posibilidad de propagarlas, ya sea por internodos o por embriogénesis somática.

Los índices de respuesta obtenidos en el presente estudio 92 ± 7.0 con un promedio de 17 embriones por callo y una eficiencia de 1.672 ± 0.48 , en un total de 10 siembras; (Tabla 5) coinciden con los reportados anteriormente por Cibrián (1991) y Villegas (1991). Bajo las condiciones de cultivo de 18 días en medio de inducción (en presencia de reguladores de crecimiento) y 24 días en medio de desarrollo (sin reguladores de crecimiento). Estas siembras se llevaron a cabo a lo largo de los experimentos de comparación de proteínas de callos embriogénicos y no embriogénicos, como controles positivos de la formación de embriones somáticos en la línea embriogénica A70.34.

Para el caso de la alfalfa no embriogénica Medicago sativa variedad Moapa, la evaluación llevada a cabo el día 42 de cultivo, es la formación de un callo, color amarillento con nula formación de embriones somáticos (Figura 2). La respuesta genotipo-



FIGURA 2.- Callos de 18 días de cultivo de las líneas embriogénica (A70.34) y no embriogénica (MOAPA) de alfalfa. Los embriones son indicados por flechas.

dependiente que se presenta en la inducción de embriones somáticos por parte de las variedades con mayor contribución genética de *M. sativa* se corrobora en la variedad Moapa, siendo esta una característica de todas las variedades mexicanas.

TABLA 5. RESPUESTA, RENDIMIENTO Y EFICIENCIA DE ES-A70.34

SIEMBRA	RESPUESTA %	RENDIMIENTO	EFICIENCIA
1	79.3	10	0.79
2	82.3	14	1.15
3	90.0	14	1.26
4	100.0	15	1.50
5	100.0	21	2.10
6	91.6	21	1.92
7	90.5	20	1.81
8	97.0	12	1.16
9	100.0	20	2.00
10	94.4	27	2.55
MEDIA	92.51	17	1.67
D.S.	6.94	5	0.48

RESPUESTA = $\#$ de callos con embriones / $\#$ total de callos \times 100.

RENDIMIENTO = $\#$ de embriones totales / $\#$ de callos

EFICIENCIA = Respuesta \times Rendimiento.

ES = Embriones somáticos.

5.2) Selección del germoplasma no embriogénico de la var Moapa.

La variedad Moapa es una alfalfa de gran interés agronómica en nuestro país, que desafortunadamente no ha podido ser regenerada por cultivo de tejidos vegetales.

De las 100 plantas probadas con la finalidad de seleccionar el material más adecuado para la comparación de callos embriogénicos y no embriogénicos, únicamente el 3 % respondieron a la inducción de

de una estructura semejante a un embrión somático, presentando ^{p41} características totalmente opuestas a las de los embriones de A70.34 (anormalidad morfológica, poco desarrollo y 0% de conversión, Figura 3).

Las plantas que presentaron la formación de embriones somáticos; se cultivaron in vitro por varias ocasiones, presentando los mismos resultados.

5.3) Propagación del material vegetativo.

Se requirieron grandes cantidades de material biológico para los experimentos de comparación de los extractos de proteínas de callos embriogénicos y no embriogénicos, por lo que fue necesario propagar las diferentes líneas de alfalfa.

Uno de los métodos para realizar la propagación, fue llevar a cabo experimentos de enraizamiento de internodos tanto para la línea A70.34 como para la línea F.1.1.

La alfalfa al ser propagada por internodos presenta un bajo índice en la formación de raíces in vitro (Peña, 1988) por lo que se trató de lograr una mayor formación del sistema radicular. Esto conlleva a la formación de la parte aérea de la planta, incluyendo pecíolos que es el inóculo empleado para la inducción de embriones somáticos.

Los resultados obtenidos para la línea F.1.1 fueron 0 % de formación de raíces.

La línea A70.34 mostró mayor formación de raíces comparada con la línea F.1.1, sin embargo, no fueron suficientes para lograr el trasplante de las plantas a condiciones ambientales, Tabla 6.



FIGURA 3.- Embrión somático de *MOAPA* de 18 días de cultivo.

TABLA 6. RESULTADOS DEL ENRAIZAMIENTO DE A70.34

TRATAMIENTO	% ENRAIZAMIENTO	PECIOLOS	ESTADO
A-1	0	7	++
A-2	25	8	+
B-1	25	15-20	+++
B-2	37.5	12	++
C-1	0	9	++
C-2	12.5	10	+
D (control)	0	5	+

+ poco vigoroso

++ vigoroso

+++ Muy vigoroso

El tratamiento que mostró mejores resultados en cuanto a la formación de peciolo (tomando como criterio el número y el estado de peciolo por inóculo) fue utilizando un solo regulador de crecimiento (AIB, 0.05mg/l) con concentración de sacarosa de 15g/l; el número de peciolo por inóculo fue de 15 a 20 siendo muy vigorosos

Por el contrario el tratamiento utilizando AIB a una concentración 0.02 mg/l y 15 g/l de sacarosa mostró ser el menos eficiente, presentando la formación de 8 peciolo por inóculo con un buen estado.

Ninguno de los tratamientos realizados en la obscuridad dio resultados favorables, el enraizamiento presentado fue de un 0% con la formación de peciolo cloróticos y de 2 a 3 por inóculo.

Por los resultados anteriormente descritos, la propagación del material biológico para el abastecimiento posterior de peciolo se realizó para la línea A70.34 con AIB (0.05 mg/l). La línea F.1.1 se propagó conforme a su protocolo de embriogénesis somática.

5.5) Manipulación para usar un solo protocolo de embriogénesis somática.

Con la finalidad de poder comparar las líneas embriogénicas y no embriogénicas bajo las mismas condiciones; se planteó la posibilidad de utilizar un solo protocolo de embriogénesis in vitro para las dos líneas embriogénicas (A70.34 y F.1.1). La línea no embriogénica se cultivo bajo las mismas condiciones de cultivo que las anteriores.

Los controles tanto para la línea A70.34 (respuesta 97% y rendimiento 12) como para la línea F.1.1 (respuesta 98% y rendimiento 15) mostraron ser superiores. El tratamiento colocando a la línea A70.34 en el protocolo de F.1.1 tuvo una respuesta de 80% con un rendimiento de 10; sin embargo, los embriones fueron morfológicamente anormales y poco desarrollados, Tabla 7.

TABLA 7. RESULTADOS MANIPULACION PARA USAR UN SOLO PROTOCOLO DE EMBRIOGENESIS SOMATICA.

LINEA	F.1.1				A70.34			
	MS		B ₅		MS		B ₅	
	1	2*	1	2	1	2	1*	2
RESPUESTA %	0	98	0	60	66	80	97	0
RENDIMIENTO	—	15	—	5	7	10	12	—
EFICIENCIA	—	1.47	—	0.3	0.42	0.80	1.16	—

1 = 2,4-D (1 mg/l) + Cinetina (0.02 mg/l).

2 = 2,4-D (8 mg/l) + Cinetina (1 mg/l).

* = control.

A70.34 utilizando el medio MS pero con la concentración normal de hormonas (1 mg/l 2,4-D y 0.02 mg/l cinetina) tuvo 66% y 7 de respuesta y rendimiento respectivamente; siendo este resultado inferior al control. La misma línea en el medio de cultivo B₅ pero con la concentración de hormonas quintuplicada mostró oxidación total.

F.1.1 en MS y B₅ con una concentración de hormonas reducidas (1 mg/l de 2,4-D y 0.02 mg/l cinetina) mostraron oxidación total; el tratamiento en B₅ con 5 mg/l de 2,4-D y 1 mg/l de cinetina tuvo una respuesta de 60% con un rendimiento de 5, sin embargo, los embriones mostraron ser poco desarrollados y anormales.

Los resultados descritos anteriormente, se pueden deber a las siguientes causas:

- a) La concentración de reguladores de crecimiento para cada sistema es diferente por lo que al alterarse (aumentando o disminuyendo) resultan insuficientes o tóxicos para el inóculo empleado.
- b) La composición de medios de cultivo B₅ (A70.34) y MS (F.1.1) varía para cada sistema de embriogénesis, por lo que al intercambiarse la composición de nitrógeno total para cada sistema se ve afectada la inducción de embriones somáticos.
- c) Otra característica a la que puede deberse la anomalía de los embriones somáticos obtenidos es que al quintuplicarse la concentración de 2,4-D, este aumenta el número de embriones con morfología anormal; esto no es solo una característica de este sistema, ya que en zanahoria (Sung y Okimoto, 1984) para obtener embriones con morfología más normal se requiere una concentración definida de la auxina. Así mismo, el inóculo debe estar en contacto por corto tiempo con el regulador de crecimiento.

Todos estos resultados nos indican que como se menciona en la literatura son tres los factores que intervienen en la regeneración de embriones somáticos: tipo y concentración de auxina utilizada, la concentración de citocinina exógena y el nivel de nitrógeno total.

5.5) Análisis de proteínas tempranas.

5.5.1) Cuantificación de proteínas.

Para cada extracción de proteínas se realizó su curva tipo respectiva, por duplicado (12 en total) mostrando un patrón reproducible. El valor promedio de la pendiente fue de 0.009 ± 0.0016 , el de la ordenada al origen fue de 0.027 ± 0.022 y el coeficiente de correlación de 0.993 ± 0.0049 . La curva tipo fue lineal en el intervalo de 0-50 μg de proteínas, Figura 4.

5.5.2 Análisis de proteínas por electroforesis en SDS-PAGE.

Por medio de este análisis fue posible apreciar la diferente composición y patrón polipeptídico de los extractos de callos embriogénicos y no embriogénicos.

El \log_{10} del peso molecular de los marcadores utilizados se presenta en la Tabla 8.

Las curvas tipo utilizadas en la determinación del peso molecular de las proteínas de la línea embriogénica (A70.34) y no embriogénica (Moapa) se muestran en las Figuras 5 y 6 respectivamente.

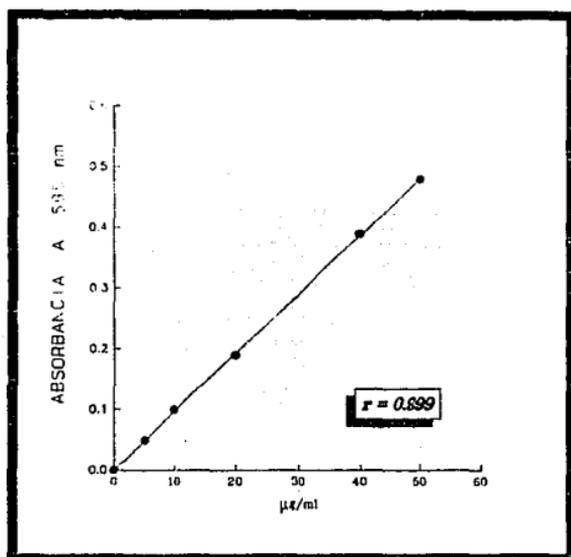
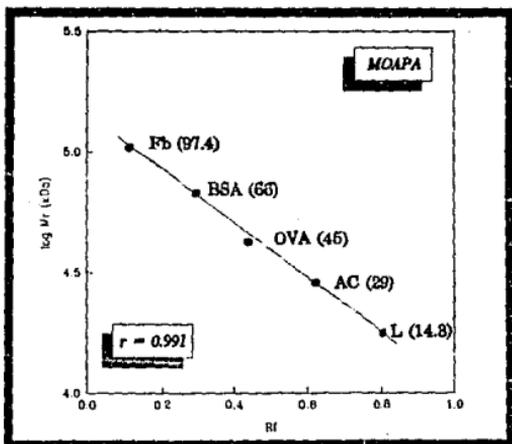
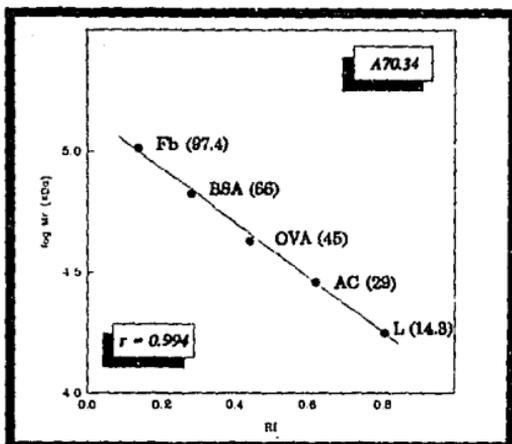


FIGURA 4. CURVA TIPO UTILIZADA EN LA EVALUACION DEL CONTENIDO DE PROTEINAS EN CALLOS EMBRIOGENICOS Y NO EMBRIOGENICOS DE ALFALFA.



FIGURAS 5 Y 6. CURVAS TIPO UTILIZADAS EN LA DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DE LAS PROTEINAS DE LOS CALLOS DE A70.34 Y DE MOAPA.

**TABLA 8. LOG₁₀ DE LOS
MARCADORES DE PESO MOLECULAR**

PESO MOLECULAR (kD)	LOG P.M.
200	5.30
97.4	4.98
68	4.83
43	4.63
29	4.46
18.4	4.26

5.6) Resultados de la cinética de callos.

La comparación de callos embriogénicos y no embriogénicos de alfalfa, se llevó a cabo mediante una cinética de cultivo, realizándose las cosechas cada tercer día durante la fase de inducción del proceso de embriogénesis somática. La evaluación de este experimento se llevó a cabo tomando los siguientes aspectos:

- a) Morfológico.
- b) Patrón de expresión cualitativo de proteínas a lo largo del cultivo para cada línea.
- c) Patrón de expresión cuantitativo de proteínas a lo largo del cultivo para A70.34 y Moapa.
- d) Comparación a nivel cualitativo de proteínas presentes y ausentes en la línea embriogénica y no embriogénica.

5.6.1) Evaluación de las características morfológicas de callos embriogénicos y no embriogénicos.

Los resultados obtenidos a nivel morfológico durante la cinética de cultivo se presentan para A70.34 y Moapa en las Tablas 9 y 10 respectivamente.

TABLA 9. MORFOLOGIA DE A70.34 DURANTE LA CINETICA DE CULTIVO.

DIAS	MORFOLOGIA
0	Inóculo de color verde intenso, de consistencia dura y con una longitud aproximada de 7-8 mm.
3	Inóculo de color verde intenso, de consistencia dura, con regiones de color blanquecino en las zonas de los cortes.
6	Inóculo de color verde más intenso con un ligero abultamiento en la zona central y regiones de color amarillo en las zonas de los cortes
9	Inóculo de color verde intenso con un notable abultamiento en la región central, en las zonas del corte la coloración del esqueleto del peciolo es blanquecina. En este día de cultivo la proliación celular empieza a ser visible.
12	Inóculo de color verde muy hinchado, la región central destaca por su alta proliferación celular, aunque, también se observa en las del corte. En la masa callosa se distinguen grupos celulares amarillos y verdes.
15	Callo con rápida proliferación celular, friable de color amarillo claro, con grupos de células que todavía conservan el color verde. En esta etapa empiezan a ser visibles zonas de color verde intenso que corresponden a los primeros estadios de desarrollo de los embriones somáticos.
18	Callo bien formado de color amarillo crema y aspecto friable. En esta etapa son claramente visibles los embriones somáticos con una morfología bien definida que corresponde a los estadios globular de corazón y torpedo.

TABLA 10. MORFOLOGIA DE MOAPA DURANTE LA CINETICA DE CULTIVO.

DIAS	MORFOLOGIA
0	Inóculo de color verde intenso, de consistencia muy dura y con una longitud aproximada de 7-8 mm.
3	Inóculo de color verde intenso, de consistencia dura, con regiones de color blanquecino en las zonas de los cortes.
6	Inóculo de color verde más intenso con un ligero abultamiento en la zona central y regiones de color amarillo claro en los bordes de las zonas de corte.
9	Inóculo de color verde intenso con un notable abultamiento en la región central, en las zonas del corte la coloración del esqueleto del peciolo es blanquecina. En este día de cultivo la proliferación celular empieza a ser visible.
12	Inóculo de color amarillento hinchado, la región central destaca por su alta proliferación celular aunque, también se observa en las del corte. En la masa callos solo se distinguen grupos de células de color amarillo.
15	Callo con rápida proliferación celular, mucho más abundante que callo de A70.34 de células de color amarillento claro. En esta etapa no se encuentra ningún indicio de formación de embriones somáticos.
18	Callo bien formado de color amarillo muy claro, con regiones de color rosado. Nula formación de embriones somáticos. En esta etapa las diferencias entre un callo embriogénico y no embriogénico son más sobresalientes.

TABLA 10. MORFOLOGIA DE MOAPA DURANTE LA CINETICA DE CULTIVO.

DIAS	MORFOLOGIA
0	Inóculo de color verde intenso, de consistencia muy dura y con una longitud aproximada de 7-8 mm.
3	Inóculo de color verde intenso, de consistencia dura, con regiones de color blanquecino en las zonas de los cortes.
6	Inóculo de color verde más intenso con un ligero abultamiento en la zona central y regiones de color amarillo claro en los bordes de las zonas de corte.
9	Inóculo de color verde intenso con un notable abultamiento en la región central, en las zonas del corte la coloración del esqueleto del pecíolo es blanquecina. En este día de cultivo la proliferación celular empieza a ser visible.
12	Inóculo de color amarillento hinchado, la región central destaca por su alta proliferación celular aunque, también se observa en las del corte. En la masa callos solo se distinguen grupos de células de color amarillo.
15	Callo con rápida proliferación celular, mucho más abundante que callo de A70.34 de células de color amarillento claro. En esta etapa no se encuentra ningún indicio de formación de embriones somáticos.
18	Callo bien formado de color amarillo muy claro, con regiones de color rosado. Nula formación de embriones somáticos. En esta etapa las diferencias entre un callo embriogénico y no embriogénico son más sobresalientes.

Las diferencias que se observan en ambas líneas de alfalfa empiezan desde la planta misma, la Moapa presenta hojas y pecíolos de mayor tamaño, lo que la hace un forraje de mejor calidad, por lo que es una variedad de gran importancia agronómica. En tanto que la línea embriogénica sus pecíolos y hojas son pequeños y no es de importancia agronómica.

En cultivo las diferencias entre ambas líneas se observan a partir del día 12, las zonas celulares de color verde que son tan evidentes en A70.34 en Moapa no aparecen. A partir del día 15 las diferencias son más notorias presentando la línea embriogénica los primeros indicios de embriones somáticos, el callo es pequeño a comparación del callo de Moapa que tiende a ser muy abundante. Esto se ha observado en otras especies en donde un callo no embriogénico es más abundante que el callo que da origen a la formación de embriones somáticos. Al día 18 de cultivo en la línea embriogénica aparece una intensa proliferación de centros meristemáticos, que originaran los embriones somáticos, esta característica se presenta hasta el día 35 de cultivo, por lo que los embriones se encuentran durante la fase de desarrollo en diferentes estadios. Esta es una característica de todos los sistemas de embriogénesis somática descritos en la literatura, es decir como un proceso asincrónico (Amirato 1987, Evans, 1981).

Por el contrario, la línea no embriogénica presenta un callo abundante de color amarillo con nula formación de embriones somáticos.

5.6.2) Patrón de expresión cualitativo de proteínas a lo largo del cultivo.

El análisis de resultados a nivel cualitativo y cuantitativo se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de poliácridamida bajo condiciones desnaturalizantes. Los geles se corrieron al 10, 12 y 14%; teniendo una mejor resolución de los polipéptidos de interés en los geles al 14%. Debido a que las proteínas que se presentaron durante la cinética de cultivo fueron de bajo peso molecular, fue necesario disminuir el poro del gel de poliácridamida aumentando la concentración total de acrilamida. En aquellos geles donde la resolución fue óptima se les practicó un análisis densitométrico.

En alfalfa A70.34, el análisis de proteínas muestra un patrón de cambios durante el tiempo de duración de la cinética de cultivo (Tabla 11 y figura 7).

TABLA 11. PATRON DE APARICION DE PROTEINAS DURANTE LA CINETICA DE CULTIVO PARA A70.34

DIAS	0	3	6	9	12	15	18
P		83	83	83	83	83	83
R							
O	61	61	61	61	61	61	61
T	51			51			51
E		46	46	46	46	46	46
I		40	40	40	40	40	40
N	32	32	32	32	32	32	32
A		28	28	28	28	27	
S	26	26	26	26	26	26	26
	15	15	15	15	15	15	15

Los pesos moleculares de las proteínas en kDa

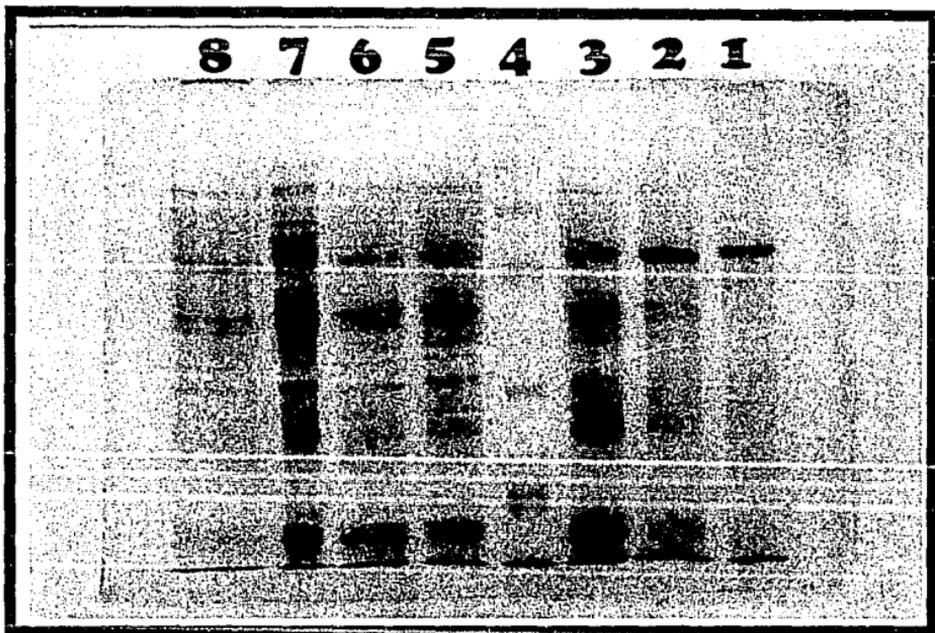


FIGURA 7.- Patrones electroforéticos durante la cinética de cultivo para A70.34. El contenido de proteínas fué de 10 $\mu\text{g}/\text{carril}$: 1= Peciolo de 0 días de cultivo, 2 = Callo de 3 días, 3= Callo de 6 días, 4= Marcadores de peso molecular conocido, 5= Callo de 9 días, 6= Callo de 12 días, 7= Callo de 15 días y 8= Callo de 18 días de cultivo.

Los cambios más evidentes se presentan el día 3 de cultivo, en donde aparecen 5 nuevos polipéptidos cuyos pesos moleculares son: 83, 46, 40 y 28 kD. A los días 6, 9, 12, 15 y 18 de cultivo éstas se mantienen junto con otros 4 polipéptidos que están presentes desde el día 0 de cultivo (61, 32, 26 y 15 kD) hasta el día 18 de cultivo.

Una proteína de interés es la de 51 kD que está presente durante el día 0, desaparece el día 3 y vuelve aparecer el día 9, posteriormente desaparece y aparece nuevamente el día 18 de cultivo

Según la clasificación de Danielson, 1976 estas proteínas corresponderían a las propias del metabolismo de la planta, que posiblemente juegan un papel estructural o enzimático incluyendo la síntesis de proteínas de reserva.

Los posibles candidatos que podrían tener un papel regulatorio serían los polipéptidos que se sintetizan de novo el día 3 de cultivo, que nos indica un cambio a nivel metabólico del tejido.

La línea no embrionógica también muestra un patrón que cambia durante la fase de cultivo; también los cambios más evidentes se presentan el día tres de cultivo en donde aparece un total de 5 polipéptidos cuyos pesos moleculares son: 75, 42, 37, 26, y 15 kD (Tabla 12 y Figura 8). Las proteínas que se mantienen a lo largo del cultivo son: 75, 42, 37, 26, 15 (aparecen a partir del día 3), 55, 29 y 24 (aparecen desde el día 0 de cultivo).

La proteína de 46 kD aparece el día cero, desaparece y vuelve aparecer el día 9 de cultivo, sin embargo, esta ya no vuelve aparecer como es el caso de la proteína de 51 kD de la línea embrionógica.

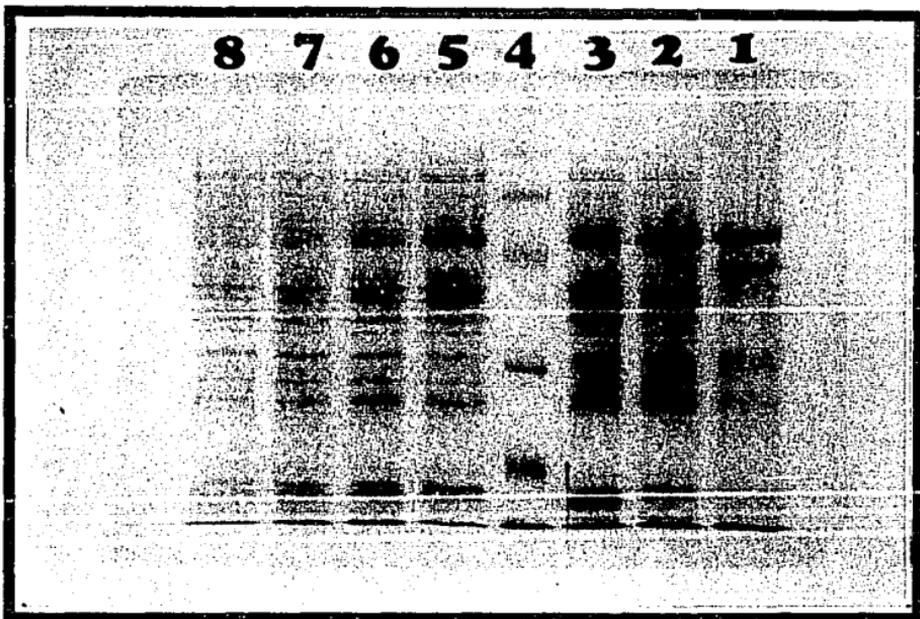


FIGURA 8.- Patrones electroforéticos durante la cinética de cultivo para *Moapa*. El contenido de proteínas fué de 10 $\mu\text{g}/\text{carril}$: 1= Peciolo de 0 días de cultivo, 2 = Callo de 3 días, 3= Callo de 6 días, 4= Marcadores de peso molecular conocido, 5= Callo de 9 días, 6= Callo de 12 días, 7= Callo de 15 días y 8= Callo de 18 días de cultivo.

TABLA 12. PATRON DE APARICION DE PROTEINAS DURANTE LA CINETICA DE CULTIVO PARA MOAPA

DIAS	0	3	6	9	12	15	18
P		75	75	75	75	75	75
R							
O	55	55	55	55	55	55	55
T	46			46			
E		42	42	42	42	42	42
I		37	37	37	37	37	37
N	29	29	29	29	29	29	29
A		26	26	26	26	26	26
S	24	24	24	24	24	24	24
		15	15	15	15	15	15

Los pesos moleculares de las proteínas en kDa

5.6.3) Patrón de expresión cuantitativo de proteínas a lo largo del cultivo.

5.6.3.1) Cuantificación de proteínas totales a lo largo de la cinética de cultivo.

Los extractos de proteínas totales se cuantificaron durante los días de duración de la cinética de cultivo, los resultados se presentan en la Figura 9 .

De manera general se observa que la línea embriogénica presenta mayor contenido de proteínas totales con respecto a la línea no embriogénica; esto no es un caso exclusivo para alfalfa sino de manera general se ha visto que un callo embriogénico muestra mayor contenido de proteínas que uno no embriogénico; en el caso de arroz (Lian y Luthe, 1987), y zanahoria en donde no solo los niveles de síntesis de proteínas se incrementaron sino también los de RNA (Fujimora et al., 1980).

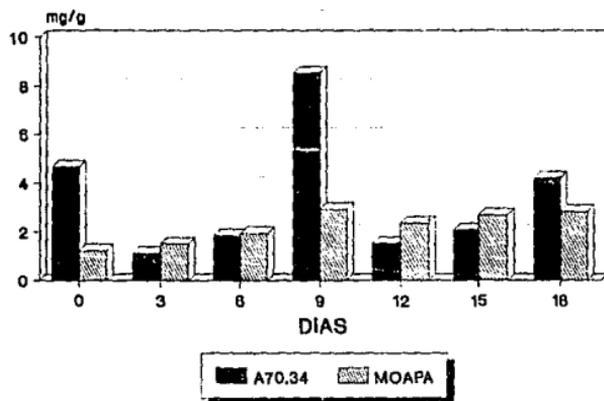
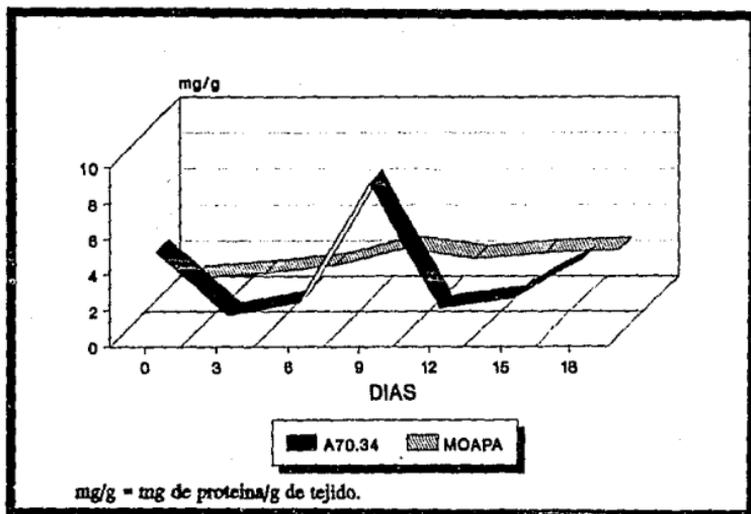


FIGURA 9.- Variación en la concentración de proteínas durante la cinética de cultivo.

En la Figura 9 se observa que en las dos líneas celulares existe un descenso en la concentración de proteínas hasta llegar a un pico el día 9 de cultivo, sin embargo, la concentración total de proteínas es como se indicó anteriormente muy superior para la línea embriogénica. En otro trabajo anterior (Hernández, 1989) donde se realizó un estudio a nivel de microscopía óptica y electrónica, a lo largo del cultivo se observó la presencia de centros meristemáticos, que son los centros de origen de los embriones somáticos, durante la fase de inducción en alfalfa; sin embargo, no reportan el día de cultivo que empiezan a ser visibles por microscopía óptica, por lo que sería de gran interés para realizar un estudio con finalidad de conocer si concide con el incremento en la concentración de proteínas que se observó el día 9 de cultivo.

5.6.3.2) Cuantificación relativa de proteínas por análisis densitográfico.

La cuantificación relativa de los polipéptidos se llevó a cabo midiendo el incremento o decremento a lo largo de la cinética. Los resultados para la línea embriogénica se muestran en la Tabla 13 y Apendice 3, Densitogramas 1-8. Para la línea no embriogénica en la Tabla 14 y Apendice 3, Densitogramas 9-16.

La concentración de proteínas para A70.34 del día 0 al día 3 de cultivo muestra una disminución aproximada del 50% para los polipéptidos. Todos los polipéptidos presentes en la línea embriogénica muestran un aumento en su concentración, aproximadamente de 30-40%, en el día 15 de cultivo, este aumento puede deberse a la aparición de los primeros embriones somáticos.

Se observan polipéptidos cuya concentración se mantiene casi

TABLA 13. CONCENTRACION RELATIVA DE LAS PROTEINAS DE A70.34 A LO LARGO DEL CULTIVO.

PROTEINA	DIAS						
	0	3	6	9	12	15	18
83	NP	100	100	100	100	140	100
61	100	72	64	61	57	81	46
51	100	NP	NP	63	NP	NP	50
46	NP	100	140	140	140	200	100
40	NP	100	140	125	120	160	85
32	100	50	68	68	68	80	47
28	NP	100	130	110	100	120	NP
26	100	58	80	60	53	70	44
15	100	50	80	71	71	100	47

Resultados dados en 1

NP - No presente

constante a lo largo del cultivo como es el de 83 kD, en cambio existen otros con gran variación en su concentración como son: 61, 51, 40, 32, 28, 26 y 15 kD.

El polipéptido de 60 kD disminuye su concentración conforme avanza el tiempo del cultivo, con excepción del día 15 que muestra un incremento.

El polipéptido de 46 kD se presenta a lo largo del cultivo, sólo está ausente al día 0; su peso molecular coincide con uno de los monómeros de actina por lo que para investigaciones posteriores sería de interés comprobarlo mediante una electrotransferencia utilizando un anticuerpo contra actina. Su concentración se incrementa a partir del día 6 con un pico del doble de concentración

el día 15 de cultivo.

El de 15 kD muestra incrementos importantes no solo el día 15 sino también el día 6 de cultivo.

Para el caso de la línea no embriogénica (Moapa) la concentración de proteínas se mantiene más constante que para A70.34; el incremento que se observó el día 15 de cultivo en A70.34, en Moapa se observa un descenso en la concentración de proteínas ya que en esta fase no existe la formación de embriones somáticos.

El polipéptido de 55 kD al igual que el de 61 en A70.34 también disminuye su concentración conforme avanza el tiempo del cultivo; pero su descenso es menos brusco que para la línea embriogénica.

TABLA 14. CONCENTRACION RELATIVA DE LAS PROTEINAS DE MOAPA A LO LARGO DEL CULTIVO.

PROTEINA	DIAS						
	0	3	6	9	12	15	18
75	NP	100	128	126	100	95	83
55	100	95	100	110	100	86	69
46	100	100	NP	120	NP	NP	NP
42	NP	100	120	130	130	118	100
37	NP	100	115	119	119	100	100
29	100	100	120	140	135	121	100
26	NP	100	110	110	110	91	89
24	100	128	143	133	133	115	NP
15	NP	100	126	114	112	93	75

Resultados dados en porcentaje

NP = No presente

El de 15 kD muestra incrementos importantes no solo el día 15 sino también el día 6 de cultivo.

Para el caso de la línea no embriogénica (Moapa) la concentración de proteínas se mantiene más constante que para A70.34; el incremento que se observó el día 15 de cultivo en A70.34, en Moapa se observa un descenso en la concentración de proteínas ya que en esta fase no existe la formación de embriones somáticos.

El poliéptido de 55 kD al igual que el de 61 en A70.34 también disminuye su concentración conforme avanza el tiempo del cultivo; pero su descenso es menos brusco que para la línea embriogénica.

El poliéptido de 15 kD aparece hasta el día 3 de cultivo pero su concentración se mantiene prácticamente constante con una ligera disminución los días 15 y 18. Para el caso de la línea embriogénica este aparece desde el día 0 de cultivo pero su concentración disminuye el día 3, incrementándose los días 6, 9, 12 y 15 de cultivo.

Al igual que otros sistemas que tienen la capacidad de inducir la formación de callo embriogénico y no embriogénico existen polipéptidos cuya concentración es mayor en los callos que tienen la capacidad de formar embriones somáticos, tal es el caso de callos de arroz; en donde un polipéptido de 40-44 kD es más abundante en el callo embriogénico (Lian y Luthe, 1987).

Los polipéptidos que se incrementan durante el cultivo para la línea embriogénica (51 y 40kD) serian candidatos para investigaciones posteriores con la finalidad de precisar si tienen un papel estructural o enzimático; ya que en otro trabajo realizado por Kochba et al., 1977 en naranja "Shamouti" encontró que la actividad de la peroxidasa se incrementa en el tejido embriogénico.

Al sobreponer los densitogramas comparando por días de cultivo

cada línea, se puede observar que los patrones polipetídicos son casi idénticos, sin embargo, existe una heterogeneidad en los pesos moleculares que presentan las bandas, esto se puede atribuir a que son variedades diferentes, ya que en otro trabajo realizado con M. sativa y M. falcata, la subunidad pequeña de la enzima Ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa-oxidasa presenta diferente peso molecular para cada especie, lo que los autores sugieren que puede tener un significado adaptativo (Daday y Whitecross,1985).

5.6.3.3) Comparación a nivel cualitativo de proteínas presentes y ausentes en A70.34 Y Moapa.

El interés principal del presente trabajo fue la comparación de extractos proteicos de callos embriogénicos y no embriogénicos de alfalfa; estos resultados se presentan en la Tabla 15.

Durante los días de cultivo se observa la aparición de bandas presentes en la línea embriogénica y no embriogénica.

En el día 0 de cultivo la proteína presente en A70.34 es de 15 kD, que aparece hasta el día 3 de cultivo en la línea no embriogénica. Otro polipéptido de interés en A70.34 es el de 83 kD que unicamente se presenta en A70.34 a todo lo largo del cultivo y se podría considerar como específica del callo embriogénico. En otros sistemas de embriogénesis somática como zanahoria, chícharo, pasto (Dactylus glomerata L.) y arroz también se encontraron proteínas específicas del tejido embrionario, Tabla 16.

Para el caso de la línea no embriogénicas presentaron proteínas específicas; un polipéptido de 75 kD que se encuentra los días 9, 12 y 15 de cultivo unicamente en Moapa y de 24 kD el día 18 de cultivo. Todos estos polipéptidos junto con el 83 kD de A70.34 son

TABLA 15. COMPARACION DE LA PRESENCIA DE PROTEINAS EQUIVALENTES ENTRE LAS DOS LINEAS DE ALPALFA

DIA	A70.34	MOAPA	A70.34 vs MOAPA	MOAPA vs A70.34
0	EQUIVALENTES		DIFERENTES	
	61	55	15	
	51	46		
	32	29		
	26	24		
3	61	55	83	75
	46	42		
	40	37		
	32	29		
	28	26		
	26	24		
	15	15		
6	61	55	83	75
	46	42		
	40	37		
	32	29		
	28	26		
	26	23		
	15	15		
9	61	55	83	75
	51	46		
	46	42		
	40	37		
	32	29		
	28	26		
	26	24		
	15	15		

El peso molecular de las proteínas en kDa

DIA	A70.34	MOAPA	A70.34 vs MOAPA	MOAPA vs A70.34
	EQUIVALENTES		DIFERENTES	
12	61 46 40 32 28 26 15	55 42 37 29 26 24 15	83	75
15	61 46 40 32 28 26 15	55 42 37 29 26 24 15	83	75
18	61 46 40 32 26 15	75 55 42 37 29 24 15	83 51	75 26

El peso molecular de las proteínas en kDa

TABLA 16. COMPARACION DE PROTEINAS DE TEJIDO EMBRIOGENICO Y NO EMBRIOGENICO EN DIFERENTES ESPECIES.

ESPECIE	T. EMBRIO.	T. NO EMBRIO.	REFERENCIA
Arroz	54 y 24	22.7	Lian y Luthé, 1987
Chicharo	70 y 45		Stirn y Jacobsen, 1987
Pasto	12, 19, 21, 23 24, 26, 27, 31 32, 36, 70	22, 49, y 51	Hahne, 1988
Zanahoria	77 y 43	24	Sung et al. 1981

T = Tejido

El peso molecular de las proteínas en kDa

candidatos para estudios más detallados con la finalidad de seguir su síntesis durante el proceso de embriogénesis somática.

El polipéptido de 83kD puede tener funciones de desarrollo más que de una proteína estructural o enzimática y por el contrario las de 75 y 24 kD pueden tener papeles como supresores del desarrollo como se ha indicado en otros sistemas modelo de embriogénesis somática (Jung y Zung, 1984).

Aunque se encontraron diferencias durante la cinética de cultivo, no es posible precisar el papel biológico que tienen éstos polipéptidos, es necesario realizar estudios más detallados para poder definir la función específica que tienen durante todos los cambios a nivel bioquímico y molecular que existen durante la diferenciación. Además de poder establecer si pueden utilizarse como marcadores bioquímicos ya sea de diferenciación ó para establecer diferencias cuando una célula se encuentra en estadio competente

o determinado.

Al analizar los datos de la tabla 16, los diferentes sistemas de embriogénesis somática presentan proteínas diferentes en el tejido embriogénico y no embriogénico, sin embargo, en ningún trabajo se especifica la función que tienen estos durante el proceso de embriogénesis in vitro además tampoco se especifica si son proteínas nucleares, citoplasmicas o de superficie

Los procesos de diferenciación en animales están mejor estudiados que en plantas, en estos se sabe el papel dinámico que juega la matriz extracelular en el desarrollo, la cual esta compuesta por una red fibrilar de proteoglicanos, y glicoproteínas entre las que encontramos moléculas de adhesión celular (CAMs) y moléculas de adhesión superficial (SAMs) incluyendo colágena (una glicoproteína rica en hidroxiprolina) (Edelman, 1988). Las CAMs son moléculas de superficie celular que median interacciones entre las células y las unen de manera homofilica; hay una familia de CAMs entre las que podemos incluir a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Las SAMs son glicoproteínas secretadas en la matriz extracelular e interactúan con las células vía receptores transmembranales conocidos como integrinas. Como ejemplos de las SAMs podemos citar a la fibronectina y la vitronectina (Edelman, 1986).

En trabajos recientes se ha enfocado la importancia que tiene la pared celular (matriz extracelular) en plantas como un modelo similar al propuesto por Edelman, ya que los primeros indicadores de diferenciación involucran cambios en la pared celular, en su forma, medida y grosor así como en sus propiedades químicas.

De hecho la mayoría de los tipos celulares que existen en plantas pueden ser definidos por la composición que existe a nivel de superficie (Lord y Sanders, 1992). Por lo que sería de gran importancia el conocer si las proteínas específicas de tejido embriogénico corresponden a proteínas de superficie ya sea de pared celular o membrana plasmática.

De manera general se conoce que estas proteínas son extensinas, arabinogalactanas, proteínas ricas en glicina y ricas en prolina que se encuentran en plantas a nivel de superficie y que están involucradas en el desarrollo vegetal, (Knox, 1990), por lo que sería de gran interés para los diferentes sistemas de embriogénesis somática ver si las proteínas "embriogénicas" son de superficie celular.

5.7) Prueba fisiológica.

Con la finalidad de observar si el extracto de 18 días de cultivo de la línea embriogénica, tuviera algún efecto sobre la inducción de embriones somáticos de la línea no embriogénica; un extracto de A70.34 se colocó en el medio de inducción de Moapa. En otra serie de estudios realizados por Cibrián (1991) y García (1993), se probó el efecto de semillas de alfalfa de diferentes estadios de desarrollo en la síntesis y acumulación de proteínas de reserva obteniéndose en algunos casos resultados positivos, dependiendo del estadio de la semilla colocada en el medio de inducción en la expresión de proteínas de reserva.

La concentración de proteínas colocada en el medio de inducción fue de 2.3 mg/l de los callos de A70.34 de 18 días de cultivo. La línea no embriogénica se sembró en este medio durante la fase de

inducción, posteriormente se realizó la extracción de proteínas de una parte del cultivo, dejando la otra mitad del cultivo como control, a la cual se efectuó el tranplante a medio de desarrollo basal

El control presentó exactamente los mismos resultados que los cultivos sin extracto de callos de A70.34, es decir nula formación de embriones somáticos, solo que el callo permaneció con un color verde durante más días de cultivo (20 días).

El extracto de proteínas se corrió en un gel de poliacrilamida al 10% bajo condiciones desnaturalizantes (Figura 10). El patrón de bandeado que muestra Moapa con o sin extracto proteico de 18 días de A70.34 es exactamente el mismo; por lo que no se obtuvo una respuesta en la inducción de embriones somáticos con extracto proteico de la línea embriogénica. Para estudios posteriores sería de interés probar una concentración mayor de proteínas, ya que en los trabajos de Cibrián y García la concentración de embriones sexuales fué de 2 g/l; además de realizar una cinética con diferentes extractos durante los días de inducción del proceso de embriogénesis somática, debido a que los resultados descritos en la sección anterior, se observa que los cambios más dramáticos ocurren entre el día 3 al 12 de cultivo, y los días 15 y 18 solo se observa la expresión fenotípica de los cambios ocurridos a nivel genotípico en los días anteriores.

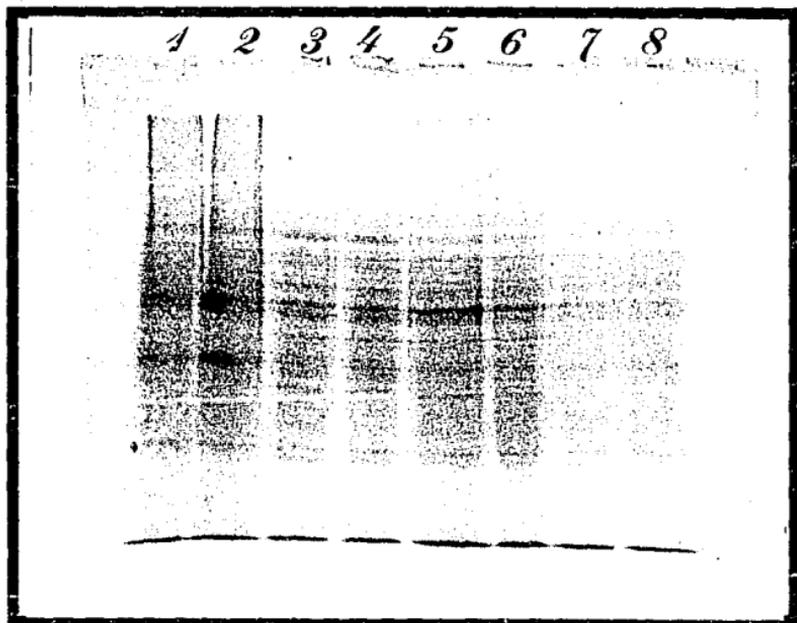


FIGURA 10.- Patrones electroforéticos en la prueba fisiológica de callos de *Moapa*. El contenido de proteínas fué de 10 μ g/carril: 1 y 2= Callo de 18 días de cultivo de A70.34, 3 y 4= Callo de *Moapa* con extracto de 10 % de A70.34, 5 y 6 = Callo de *Moapa* con extracto de 15 % de A70.34, 7 y 8 = Callo de 18 días de cultivo de *Moapa*.

VI.- CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados anteriores expuestos se pueden concluir algunas diferencias entre los callos embriogénicos y no embriogénicos de alfalfa:

- La inducción de embriones somáticos en alfalfa es un proceso genotipo dependiente.
- El sistema de embriogénesis somática en alfalfa tiene la capacidad de formar dos tipos de callos uno poco abundante, friable y embriogénico, otro amarillento abundante y no embriogénico.
- Las variedades con mayor contribución genética de Medicago sativa presentan menos del 10% en respuesta a la formación de embriones in vitro.
- A nivel morfológico las diferencias entre un callo embriogénico y uno no embriogénico empiezan a partir del día 12 de cultivo.
- La presencia de embriones somáticos por parte de la línea embriogénica se presentan el día 15 de cultivo en tanto que la no embriogénica presenta nula formación de embriones somáticos.
- En cuanto a los polipéptidos de los callos embriogénicos y no embriogénicos se observaron dos comportamientos:
 - a) Aparición desde el inicio del cultivo (día 0) y su presencia hasta el final de la etapa de inducción del proceso de embriogénesis somática.
 - b) Aparición y desaparición durante los diferentes días de cultivo.

- A nivel bioquímico un callo embriogénico presenta mayor contenido de proteínas que un callo no embriogénico.
- Los cambios más drásticos en la síntesis de nuevas proteínas se presentan tanto para la línea embriogénica como para la línea no embriogénica el día 3 de cultivo.
- Existen polipéptidos cuya concentración relativa varía a lo largo del cultivo; ya sea incrementándose o disminuyendo.
- El polipéptido de 83 kD es específico de la línea embriogénica.
- Los polipéptidos de 75 y de 66 kD sólo se presenta en la línea no embriogénica.

Los resultados obtenidos en el presente estudio fueron obtenidos a nivel de proteínas totales, por lo que sería de gran interés poder realizar fraccionamiento celular con la finalidad de definir si las proteínas específicas de cada callo son nucleares, citoplásmicas o de superficie.

Por otro parte con la proteína específica del callo embriogénico (83 kD) obtener un anticuerpo, con la finalidad de realizar un seguimiento de esta proteína durante todo el proceso de embriogénesis somática y poder definir si juega un papel importante durante la diferenciación.

La importancia de las proteínas de superficie (tanto de membrana plasmática como de pared celular) han sido objeto de pocos estudios por lo que sería de gran interés hacer un seguimiento de éstas durante una cinética de cultivo tanto en la línea embriogénica como en la no embriogénica, con la finalidad de detectar diferencias y definir si pueden ser la contraparte de las proteínas de la matriz extracelular en animales que juegan un papel durante el desarrollo (CAMs y SAMs).

L I T E R A T U R A C I T A D A

- 1) Ammirato, P. V. (1987). Organizational events during somatic embryogenesis. En: Plant tissue and cell culture. V. J. Green, C. E., Somers, D. A., Hackett, W. P. & Biesboer, D. D. Eds. Alan, R. Liss Inc. New York. pp. 57-81.
- 2) Ammirato, P. V. (1983). Embryogenesis. En : Handbook of Plant of cell culture, Vol. 1. D. A. Evans Eds. Macmillan Publ. Co., pp. 82-123.
- 3) Atanassov, A. & Brown, D. C. (1984). Plant regeneration from suspension culture and mesophyll protoplast of Medicago sativa L. Plant Cell Tissue and Organ Culture 3, 149-162.
- 4) Barba, A.A. (1987). Cultivo de callos. En: Cultivo de tejidos vegetales. Hurtado, D, V, y Merino, Eds. M. E. Trillas. México p. 232.
- 5) Barnes, D. K., E. T. Bingham, J. D. Axtel & W. V. Davis (1972) La flor, los mecanismos de esterilidad y el control de la polinización. En: Hanson, C. H. Ed. Ciencia y Tecnología de la alfalfa Tomo I. Uruguay. Ed. Agropecuaria Hemisferio Sur.
- 6) Bolton, J. L. & Baenziger, H. (1972). World distribution and historical developments. En: Alfalfa Science and Technology Hanson, C. H. Eds. Am. Society of Agronomy. U. S. A. pp. 1-34
- 7) Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analyt. Biochem. 72, 248-324.
- 8) Canizales, D. J. A. (1966). La alfalfa, un buen forraje. Dirección de Agricultura y Ganadería. Depto de Divulgación. Toluca, México. p. 231.
- 9) Chrambach, A. & Rodbard, D. (1981) Quantitative and preparative polyacrilamide gel electrophoresis. En: Gel electrophoresis : a practical approach. Hames, B,D. Ed. IRL Washington pp. 279.
- 10) Cibrián Tovar, A. (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. México, D.F. 203pp.
- 11) IV Censo, agrícola, ganadero y ejidal, (1981) I.N.E.G.I.México
- 12) Daday, H. V. & Whitecross, I. M. (1985). Heterogeity of alkaline small subunits of ribulose 1, 5 biphosphate carboxylase oxygenase from Medicago sativa and M. falcata. Plant Cell Report. 213-215.

- 13) Danielson, C. E. (1976). Seed proteins. *Physiol. Plant.* 9,212.
- 14) Dirección general de producción y extensión agrícola. Banco Nacional de Crédito Rural, S. A. S.A.R.H. (1980). Programa coordinado de asistencia técnica. Agenda técnica agrícola. Cultivos de inv-pr. Hidalgo zona IV. Chapingo-México. pp 114.
- 15) Evans, D. A. (1981). Growth and behavior of cell cultures. En *Plant tissue culture-methods and applications in agriculture*. Accadenis. Press. New York. pp. 45-113.
- 16) Edelman, G. M. (1986). Cell adhesion molecules in the regulation of animal form and tissue pattern. *Annu. Rev. Cell Biology.* 2, 81-116.
- 17) Edelman, D. G. (1988). *Topobiology*. *Sci. Am.* 261, 76-88.
- 18) Fujimora, T., Komamine, A. & Matsumoto, H. (1980). Aspects of DNA, RNA and proteins synthesis during somatic embryogenesis in a carrot suspension culture. *Physiol. Plant.* 49, 255-260.
- 19) Gamborg, O.L., Miller, A. & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50, 151-158.
- 20) García de los Santos, G. (1987). Selección de líneas clonales de alfalfa (*Medicago sativa* L.) por su capacidad productiva y calidad de semillas. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. Colegio de posgraduados. Montecillos. México. 134 pp.
- 21) García, P. E. (1993). Cambios en el contenido de proteínas de reserva en embriones somáticos de alfalfa (*Medicago sativa* L.) por variaciones en el medio de cultivo. Tesis profesional para obtener el título de Biólogo U. N. A. M. E. N. E. P., unidad Zaragoza. México, D. F. 77 pp.
- 22) Guía para la asistencia técnica y agrícola, (1985) S.A.R.H. I.N.I.A. México.
- 23) Hahne, G, & Mayer, J. (1988). Embryogenic and callus specific proteins in somatic embryogenesis of the grass, *Dactylis glomerata* L. *Plant Science* 55, 267-279.
- 24) Hames, B. D. (1981). *Gel electrophoresis: a practical approach*. IRL Press Limited, London and Washington, D. C. 290 pp.
- 25) 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., E. N. E. P., unidad Zaragoza. México, D. F. 173 pp.
- 26) Hughies, H. D., et. al. (1978). Forrajes. La ciencia de la agricultura basada en la producción de pastos. C. E. C. S. A., México. D. F. 758 pp.

- 27) Información agropecuaria y forestal, (1983) S. A. R. H., D. G. E. A. México.
- 28) Jung, H. & Z. R. Zung. (1984). Two-dimensional gel analysis of carrot somatic embryonic proteins. *Plant Molecular Biology Reporter*. 2 (3), 19-25.
- 29) Knox, P. (1990). Emerging patterns of organization at the plant cell surface. *J. Cell Science*. 96, 557-561.
- 30) Kond, K., Sugimoto, T. & Saio, K. (1986). Changes in storage protein components of developing soybean seeds (*Glycine max* var. Enrei. *Agric. Biol. Chem.* 50 (3), 581-587.
- 31) Kochba, J., S. Lavee & P. Spiegel-Roy. (1977). Differences in peroxidase activity and isoenzymes in embryogenic and non-embryogenic "Shamouti" orange ovular callus lines. *Plant Cell Physiol.* 18, 463-467.
- 32) Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- 33) Lian, L. & Luthe, D. (1987). Analysis of proteins from embryogenic and non-embryogenic rice (*Oryza sativa* L.) calli. *Plant Science*. 48, 181-188.
- 34) Lord, E. M. & Sanders, L. C. (1992). Roles for the extracellular matrix in plant development and pollination: a special case of cell movement. 153, 16-28.
- 35) Meijer, E. G. M. & Brown, D. C. W. (1987). Role of exogenous nitrogen and sucrose in rapid high frequency somatic embryogenesis in *Medicago sativa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 10, 473-497.
- 36) Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15, 473-497.
- 37) Peña, C. G. (1988). Encapsulación de embriones somáticos obtenidos *in vitro*. Tesis profesional para obtener el título de Biólogo. U. N. A. M., E. N. E. P. unidad Zaragoza. México. D. F. 178 pp.
- 38) Ramagopal, S. (1989). Barley proteins associated with tissue dedifferentiation. *J. Physiol.* 134, 395-405.
- 39) Rojas, H. M. (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. México. D. F. 165 pp.
- 40) S. A. R. H. (1981-1982). Variedades autorizadas de los principales cultivos.

- 41) S. A. R. H.- D. G. E. A. (1983). Información agropecuaria y forestal.
- 42) Shin, W. & Ruoho, A. (1981). A method for detecting nanogram amounts on proteins on sodium dodecyl sulfate-Poliacryamide. Gels. Analytical Biochemistry 110, 171-175.
- 43) Stirn, M. S. & Jacobsen, J. (1987). Marker proteins for embryogenic differentiation patterns in pea callus. Plant Cell Reports 6, 50-54.
- 44) Street, H. E. (1977). Plant tissue and cell culture botanical monographs. Vol. II Blackwell Scientific. Publications Oxford. 614 pp.
- 45) Stuart, D. A., & Nelsen, J. (1988). Isolation and characterization of alfalfa 7S and 11S seed storage proteins. J. Plant Physiol. 132, 129-133.
- 46) Sung, R. Z. & Okimoto, R. (1981). Embryonic proteins in somatic embryos of carrot. 78 (6), 3683-3687.
- 47) Sung, R. Z. Fienber, A., Fienberg, A., Chorneau, R., Borkird C., Furner, I. & Smith, J. (1984). Developmental biology of embryogenesis from carrot culture. Plant Mol. Biol. Reporter 2 (3), 3-14.
- 48) Villegas, T. L. (1986). Developmental study of somatic embryo genesis in Medicago sativa. Research proposal to the department of Biology. University of Ottawa. Canadá. 27 pp.
- 49) Villegas, T. L. (1991). Embriogénesis somática en Medicago sativa L. y la fisiología de su desarrollo. Tesis Doctoral. E. N. C. B.-I. P. N. México, D. F. 193 pp.
- 50) Wareing, P. F. and T. Al-Chalabi. (1985). Determination in plant cell. Biologia Plantarum. 27 (4-5), 241-248.

APENDICES

APENDICE 1. MEDIOS DE CULTIVO

B5 Modificado por Villegas (1991)	
Macronutrientes	mg/l
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	150
MgSO ₄ 7H ₂ O	500
KNO ₃	2528
(NH ₄) ₂ CIT.DIBASICO	
Micronutrientes	
MnSO ₄ H ₂ O	10
H ₃ BO ₃	3
ZnSO ₄ 7H ₂ O	2
NaMoO ₄ 2H ₂ O	0.25
CuSO ₄	0.025
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025
KI	0.75
Na ₂ EDTA	37.3
FeSO ₄ 7H ₂ O	27.8
Vitaminas	
Ac. Nicotínico	1
Tiamina-HCl	10
Piridoxina-HCl	1
Mio-inositol	100
Adenina	1

MS (Murashige, T & Skoog, F., 1962)	
Macronutrientes	
	mg/l
MgSO ₄ 7H ₂ O	370
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃ *	1900
KH ₂ PO ₄	170
Micronutrientes	
H ₃ BO ₃	6.200
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.500
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025
KI	0.880
CoCl ₂ 5H ₂ O	0.025
NaMoO ₄ 2H ₂ O	0.250
MnSO ₄ H ₂ O	16.900
Na ₂ EDTA	37.300
FeSO ₄ 7H ₂ O	27.800
Vitaminas	
Glicina	2.0
Ac. Nicotínico	0.5
Piridoxina-HCl	0.5
Tiamina-HCl	1.0
Mio-inositol	100.0

* MS modificado 2200 mg/l

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

APENDICE 2. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Soluciones	Preparación
I Acrilamida 30%	30 g para 100 ml de agua
II Bisacrilamida 2%	2 g para 100 ml de agua
III Tris 1M pH 8.8	36.6 g en 100 ml de agua ajustar pH 8.8
IV Tris 1M pH 6.8	21.1 g para 100 ml de agua ajustar pH 6.8
V SDS 20%	20 g para 100 ml de agua
VI Amortiguador de muestra	SDS 5 g, glicerol 5 ml, Tris-base 2.44 g, 0.01% de azul de bromofenol y 5% de de B mercaptoetanol en 50 ml de agua
VII Amortiguador de corrida	glicina pH 8.4 en 100 ml de agua
VIII Fijador y colorante	Metanol 50%, ác. acético glacial 10%, azul de Cooma ssie 0.25% y 50 ml de agua
IX Solución desteñidora	Metanol 40%, ác. acético glacial 10% y agua 50%.

Preparación del gel de corrida			
Solución	10%	12%	14%
Acrilamida	5.0ml	6.4ml	7.0ml
Bisacrilamida	2.0ml	2.5ml	2.8ml
Tris pH 8.8	5.6ml	5.6ml	5.6ml
SDS	75.0µl	75.0µl	75.0µl
H ₂ O	2.2ml	500.0µl	
TEMED*	6.5µl	45.0µl	45.0µl
PSA*	45.0µl	7.5µl	6.5µl

* Catalizadores.

Preparación del gel concentrador	
Solución	5%
Acrilamida	850 μ l
Bisacrilamida	350 μ l
Tris pH 6.8	620 μ l
SDS	25 μ l
H ₂ O	3 μ l
TEMED	5 μ l
PSA*	25 μ l

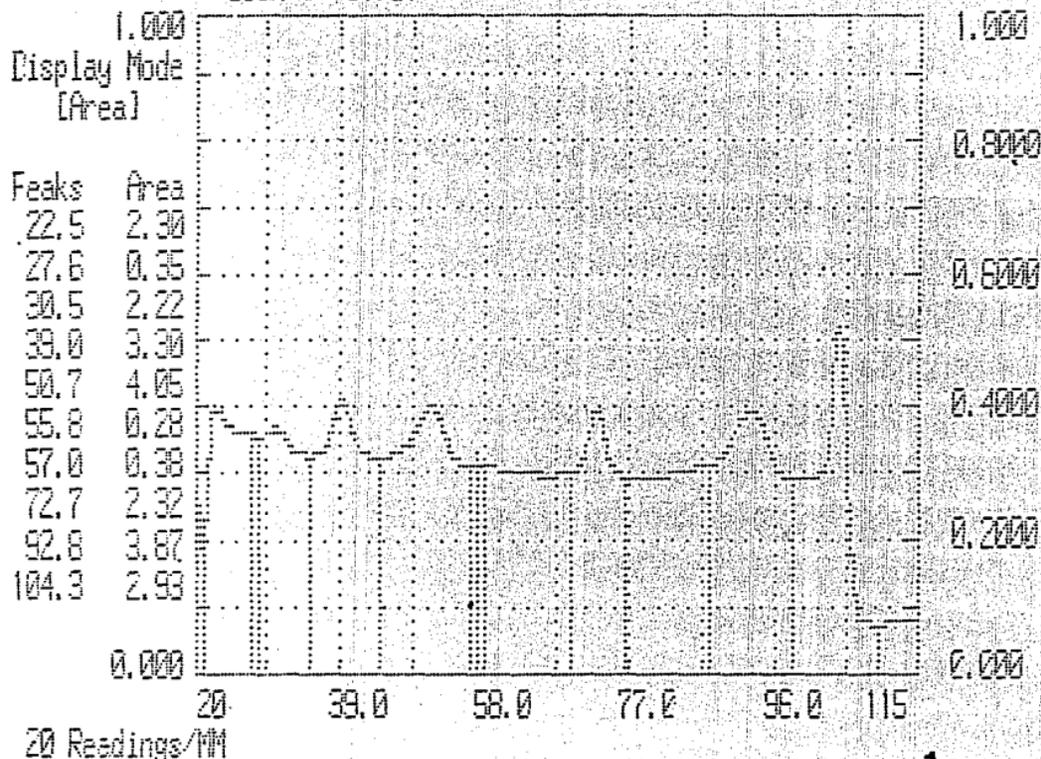
* Persulfato de amonio.

APENDICE 3. Densitogramas

Densitograma 1.	Marcadores de peso molecular de A70.34.
Densitograma 2.	Día 0 de cultivo para A70.34.
Densitograma 3.	Día 3 de cultivo para A70.34.
Densitograma 4.	Día 6 de cultivo para A70.34.
Densitograma 5.	Día 9 de cultivo para A70.34.
Densitograma 6.	Día 12 de cultivo para A70.34.
Densitograma 7.	Día 15 de cultivo para A70.34.
Densitograma 8.	Día 18 de cultivo para A70.34.
Densitograma 9.	Marcadores de peso molecular de Moapa.
Densitograma 10.	Día 0 de cultivo para Moapa.
Densitograma 11.	Día 3 de cultivo para Moapa.
Densitograma 12.	Día 6 de cultivo para Moapa.
Densitograma 13.	Día 9 de cultivo para Moapa.
Densitograma 14.	Día 12 de cultivo para Moapa.
Densitograma 15.	Día 15 de cultivo para Moapa.
Densitograma 16.	Día 18 de cultivo para Moapa.

Scan # 01.01

Baseline: [None]



TRACE

1

λ	ABS	SOURCE	MODE	MM	ABS
560.0	0.3621	Visible	Scan	57.00	0.314E

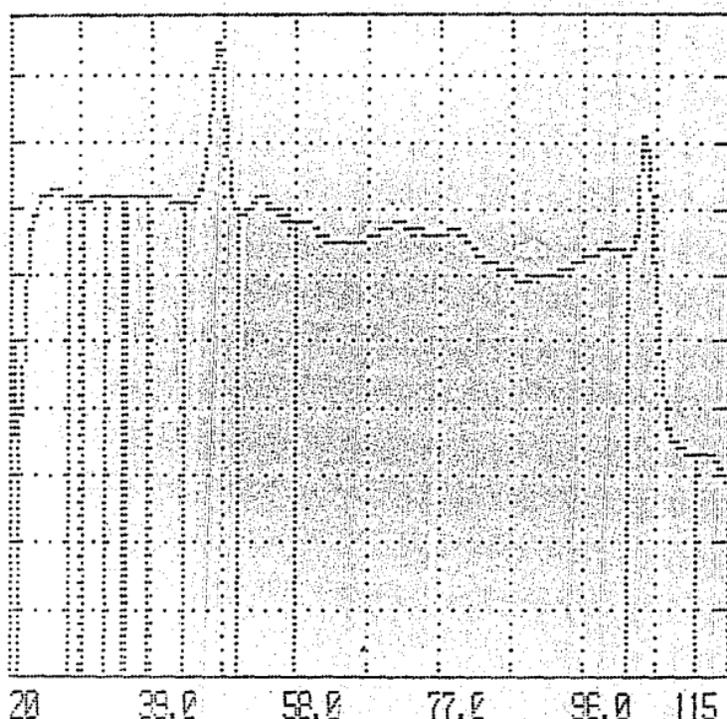
Scan # 01.01

Baseline: [None]

1.000
Display Mode
[Area]

Peaks	Area
26.1	4.35
27.8	1.52
32.0	2.12
34.1	1.55
35.0	0.40
36.4	2.17
39.9	3.45
47.6	5.58
53.2	5.42
103.8	4.57

0.000



1.000

0.8000

0.6000

0.4000

0.2000

0.000

20 Readings/MM

TRACE 2

λ
580.0

ABS
0.7227

SOURCE
Visible

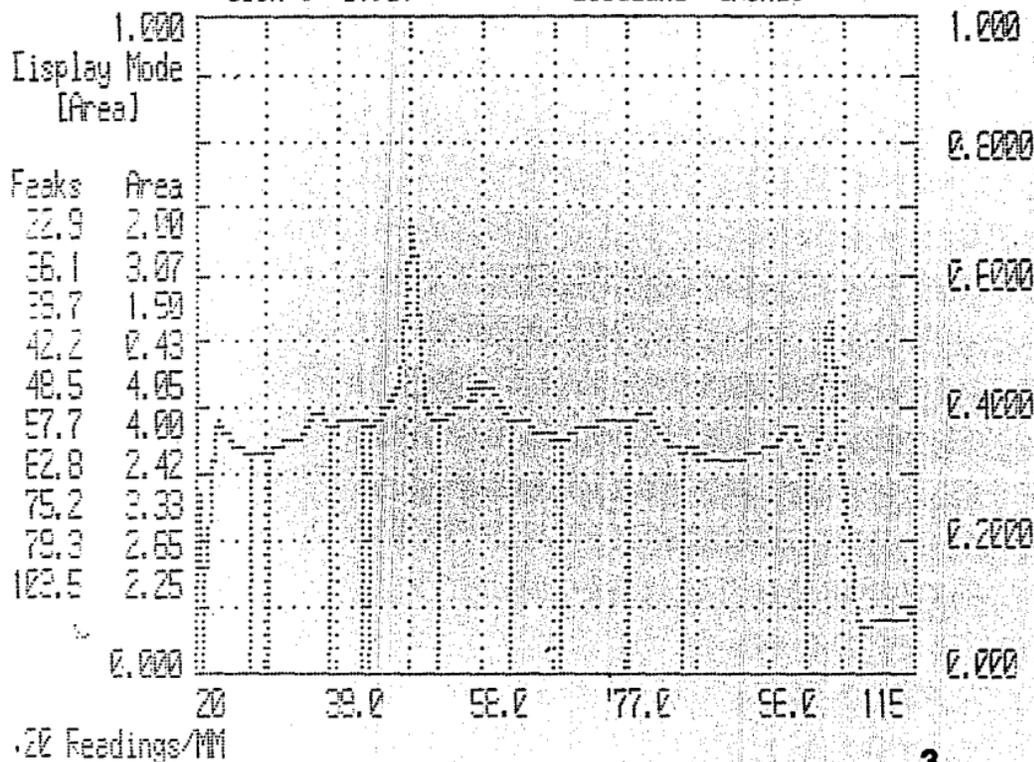
MODE
Scan

MM
57.00

ABS
0.8894

Scan # 01.01

Baseline: [None]

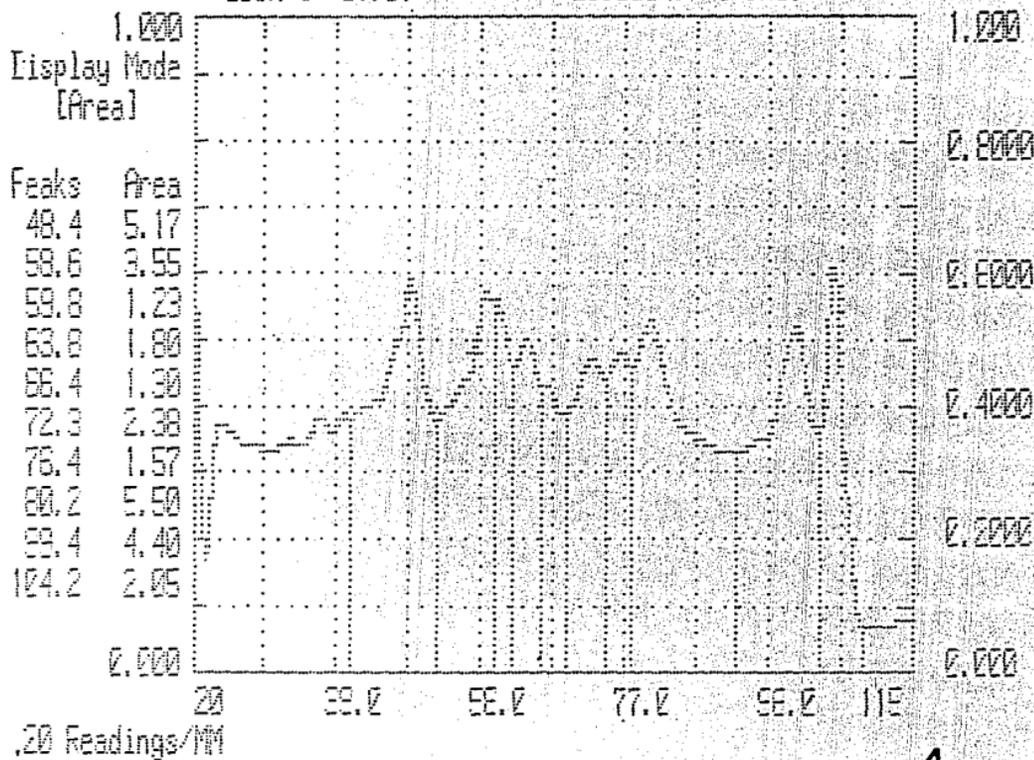


TRFCE 3

λ	ABS	SOURCE	MODE	MP	FEE
560.0	0.3388	Visible	Scan	57.00	0.4388

Scan # 01.01

Baseline: [None]



TRFCE

4

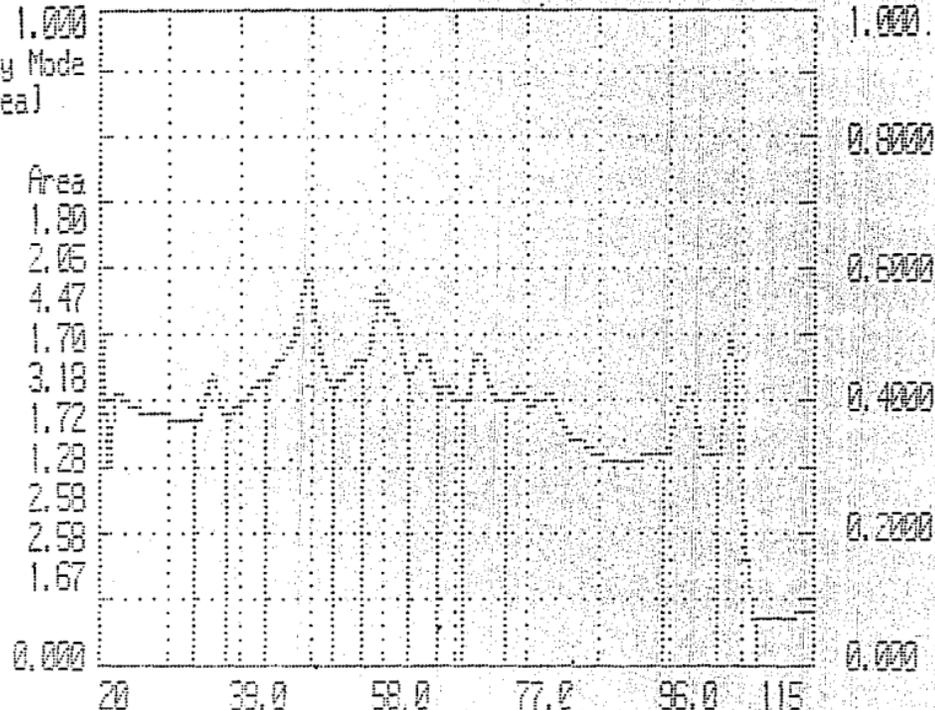
λ	PBS	SOURCE	MODE	MP	PBS
580.0	0.38E7	Visible	Scan	57.00	0.40E1

Scan # 01.01

Baseline: [None]

1.000
Display Mode
[Area]

Peaks	Area
35.0	1.80
41.8	2.05
47.6	4.47
54.7	1.70
57.5	3.18
63.0	1.72
65.9	1.28
70.3	2.58
98.2	2.58
103.9	1.67



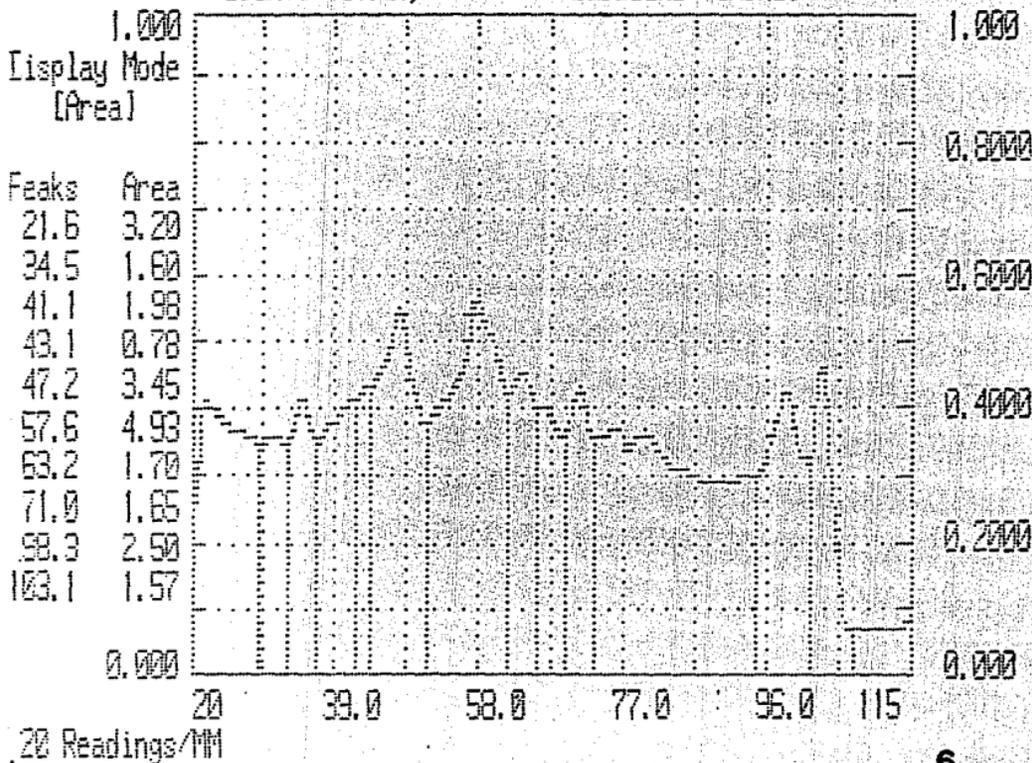
20 Readings/MM

TRACE 5

λ	ABS	SOURCE	MODE	MM	ABS
529.0	0.3771	Visible	Scan	57.00	0.5545

Scan # 01.01,

Baseline: [None]



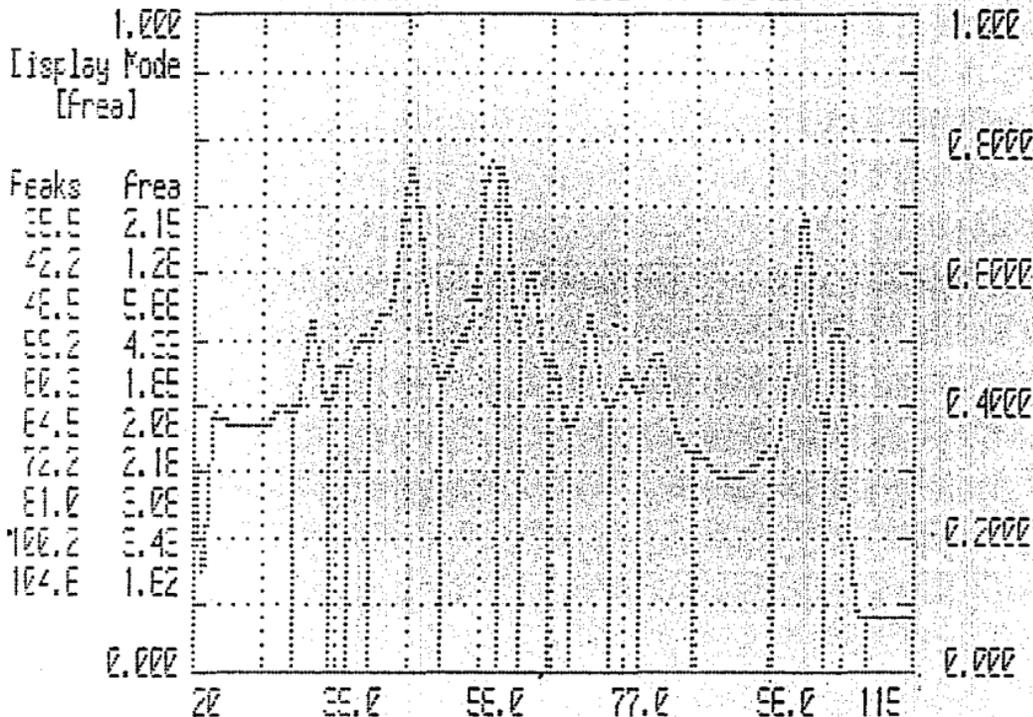
TRACE

6

A	ABS	SOURCE	MODE	MM	ABS
500.0	0.3622	Visible	Scan	57.00	0.5448

Scan # 01.01

Baseline: [None]



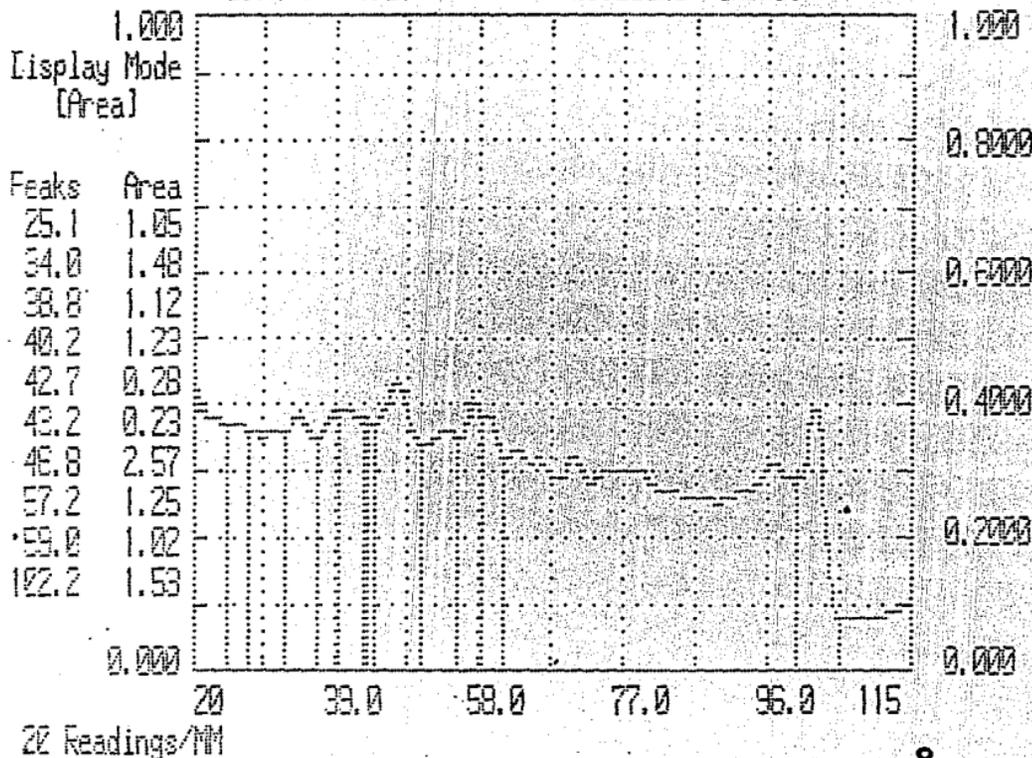
00 Readings/MY

TRACE 7

λ	FEE	SOURCE	PCIE	MY	FEE
560.0	0.577E	Visible	Scan	57.00	0.5E27

Scan # 01.01

Baseline: [None]

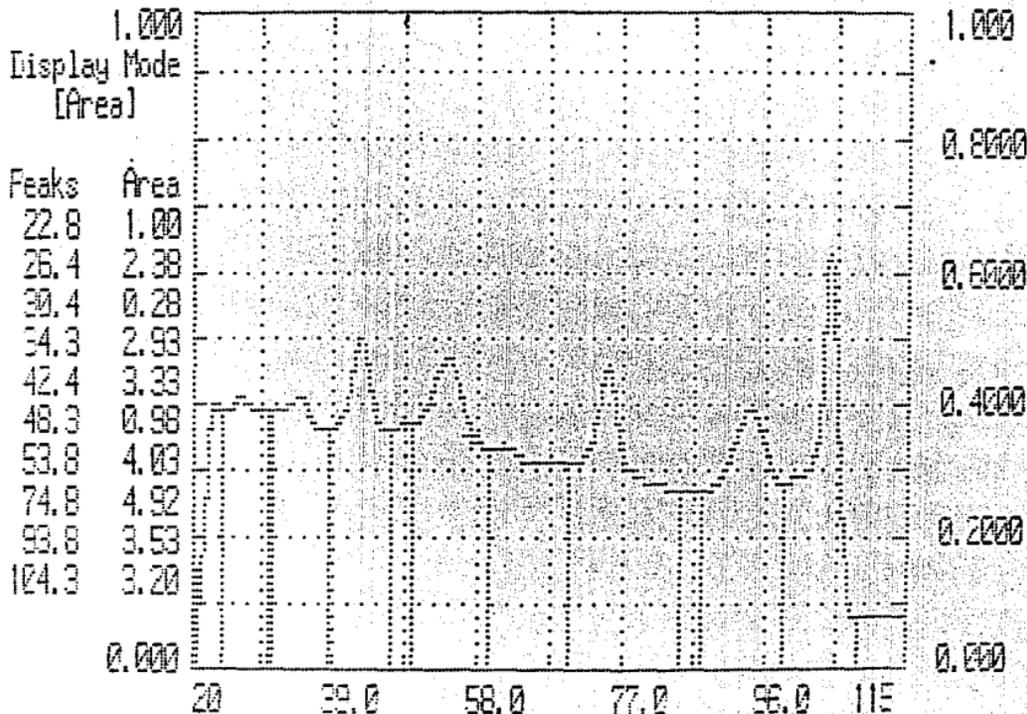


TRACE 8

λ	ABS	SOURCE	MODE	NM	ABS
592.0	0.3638	Visible	Scan	57.00	0.4014

Scan # 01.01

Baseline: [None]



20 Readings/MM

TRACE

2

λ 560.0

ABS 0.3940

SOURCE Visible

MODE Scan

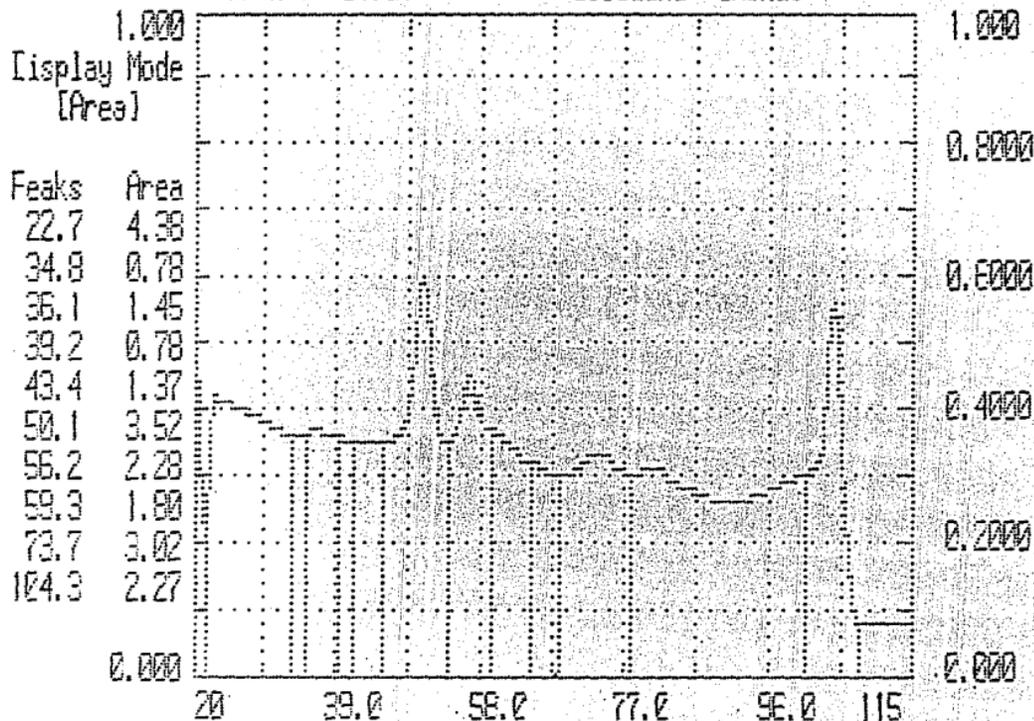
MM 57.00

ABS 0.3575

ued.

Scan # 01.01

Baseline: [None]

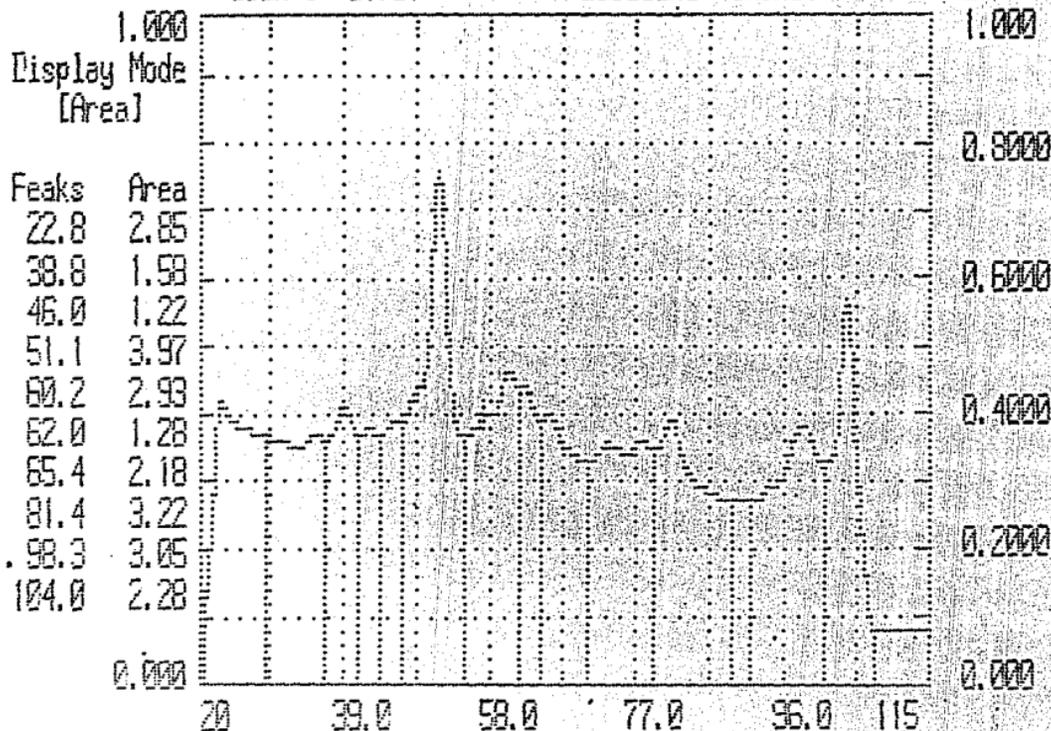


.20 Readings/MM

TRACE 10

λ	ABS	SOURCE	MODE	MM	RES
580.0	0.3795	Visible	Scan	57.00	0.42E1

Scan # 01.01 , Baseline: [None]



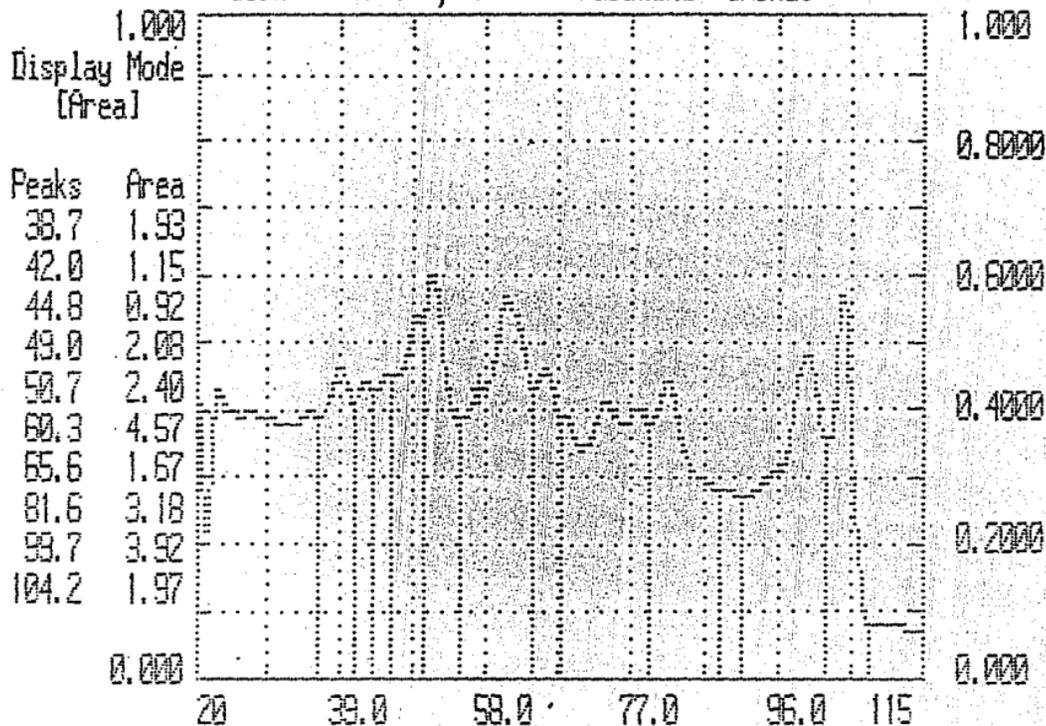
20 Readings/111

TRACE 11

λ	ABS	SOURCE	MODE	MM	RES
560.0	0.3881	Visible	Scan	57.00	0.4007

Scan # 01.01 ,

Baseline: [None]



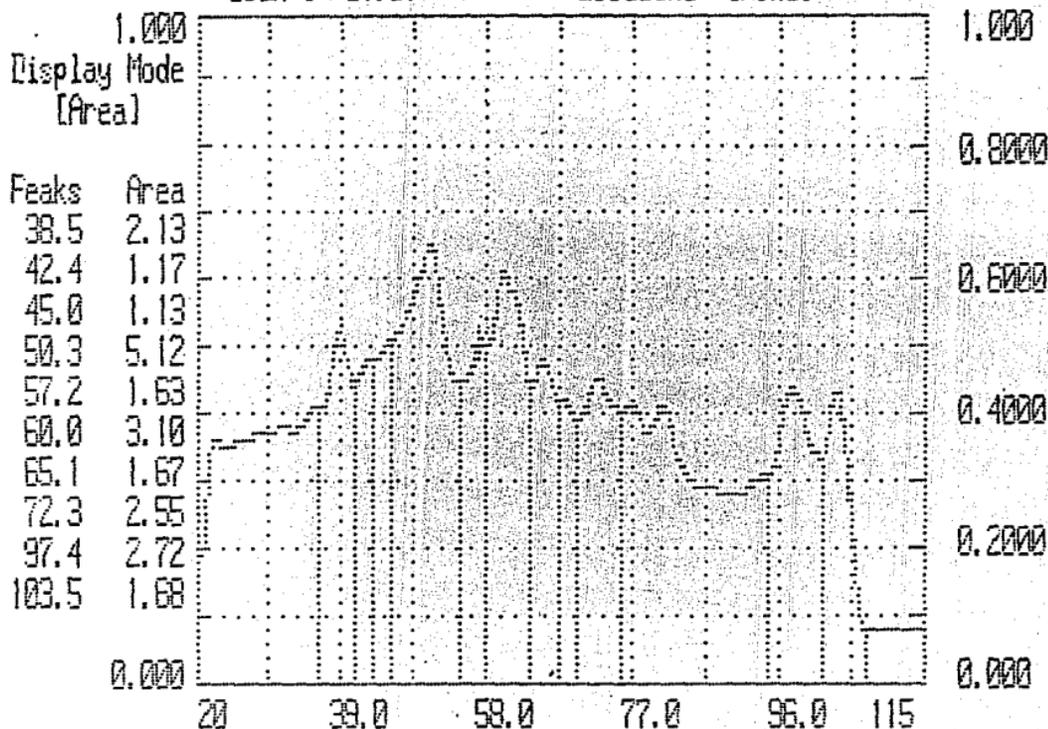
20 Readings/MM

TRACE **12**

λ	ABS	SOURCE	MODE	MM	ABS
560.0	0.3000	Visible	Scan	57.00	0.4321

Scan # 01.01

Baseline: [None]



Peaks	Area
38.5	2.13
42.4	1.17
45.0	1.13
50.3	5.12
57.2	1.63
60.0	3.10
65.1	1.67
72.3	2.55
97.4	2.72
103.5	1.68

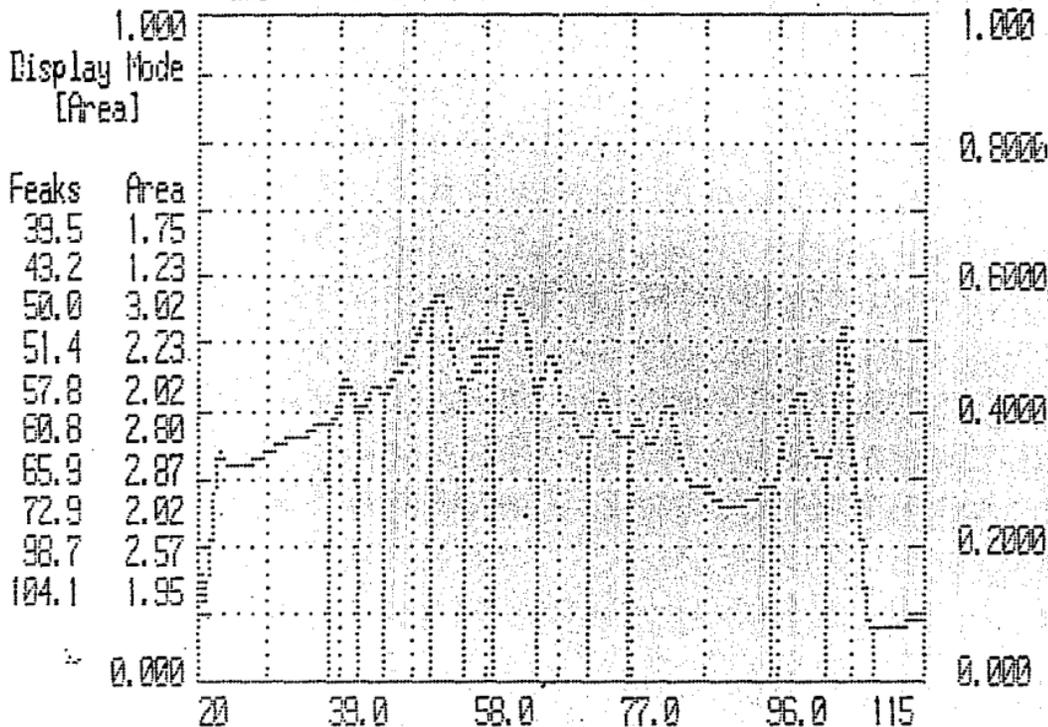
20 Readings/MM

TRACE 13

λ	ABS	SOURCE	MODE	MM	ABS
560.0	0.3771	Visible	Scan	57.00	0.5091

Scan # 01.01'

Baseline: [None]



20 Readings/MM

TRACE 14

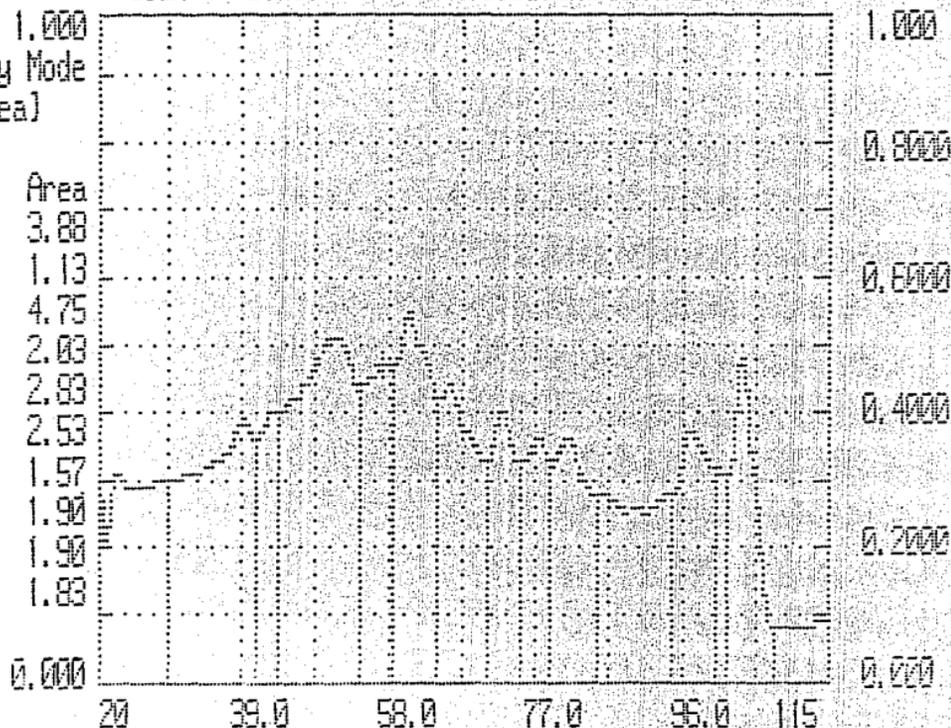
λ	ABS	SOURCE	MODE	MM	ABS
560.0	0.3485	Visible	Scan	57.00	0.4857

Scan # 01.01

Baseline: [None]

1.000
Display Mode
[Area]

Peaks	Area
38.8	3.88
42.8	1.13
50.6	4.75
57.4	2.03
60.2	2.83
65.4	2.53
72.5	1.57
81.1	1.90
95.8	1.90
103.7	1.83



20 Readings/MM

TRACE

15

X
500.0

ABS
0.3031

SOURCE
Visible

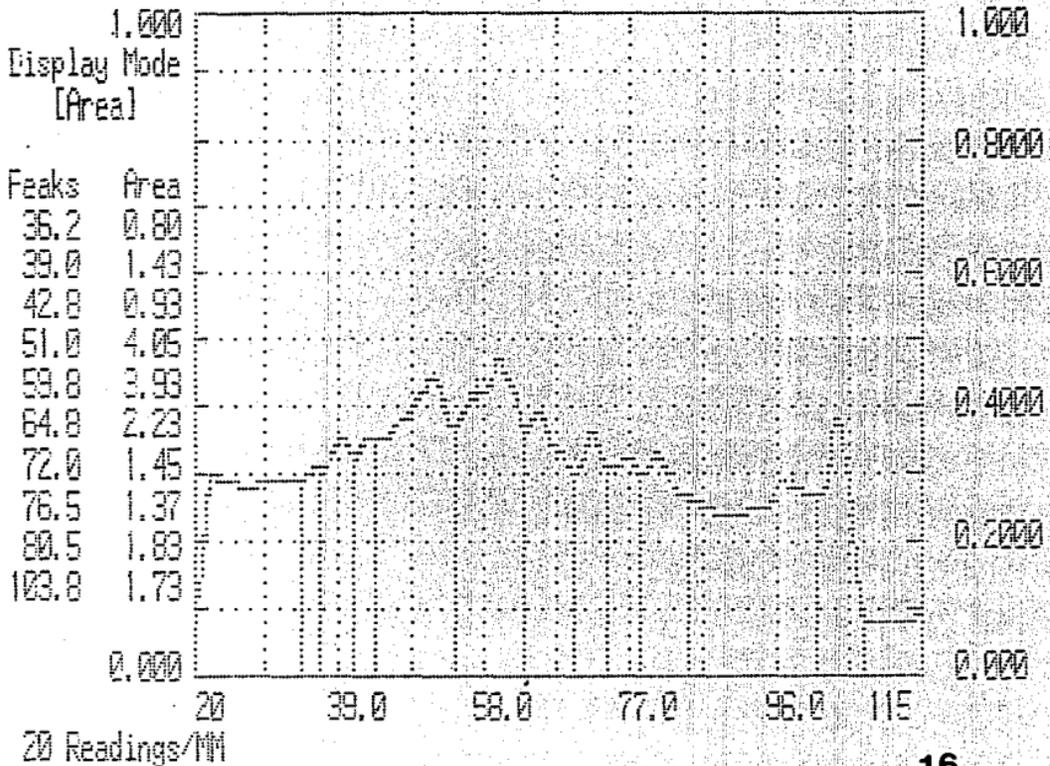
MODE
Scan

MM
57.00

ABS
0.4730

Scan # 01.01

Baseline: [None]



20 Readings/MM

TRACE 16

λ	AES	SOURCE	MODE	MM	AES
500.0	0.2910	Visible	Scan	57.00	0.4200