

159
zej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**"ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS EN
SUSPENSION DE CELULAS
DE MAIZ Var. VS-22"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

EDUARDO ROMAN GONZALEZ



**FACULTAD DE CIENCIAS
DIRECCION GENERAL**

MEXICO, D. F.

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CIUDAD UNIVERSITARIA



FACULTAD DE CIENCIAS
División de Estudios
Profesionales
Exp. Núm. 55

UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. EN C. JOAQUIN CIFUENTES BLANCO
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Universidad Nacional Autónoma de México
P r e s e n t e

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizo el pasante EDUARDO ROMAN GONZALEZ

con el título: "ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS EN SUSPENSION DE CELULAS DE MAIZ VAR. VS-22".

Consideramos que reúne los méritos necesarios para obtener el título de BIOLOGIA.

Comunicamos lo anterior para los fines a que haya lugar.

Atentamente
México, D. F., a

- | | | | |
|-----|-------------------|-------------------------------------|---------------------|
| 1.- | <u>DRA.</u> | <u>ESTELA SANCHEZ QUINTANAR</u> | |
| | grado | Nombre (s) | Apellidos completos |
| 2.- | <u>BIOL.</u> | <u>MARIA DE LOURDES LOPEZ CURTO</u> | |
| | grado | Nombre (s) | Apellidos completos |
| 3.- | <u>BIOL.</u> | <u>GUILLERMINA MURGUA SANCHEZ</u> | |
| | grado | Nombre (s) | Apellidos completos |
| 4.- | <u>Sup. BIOL.</u> | <u>MARIA AURORA ALCAZAR PESTAÑA</u> | |
| | grado | Nombre (s) | Apellidos completos |
| 5.- | <u>Sup. DR.</u> | <u>GUTILLERMO LAGUNA HERNANDEZ</u> | |
| | grado | Nombre (s) | Apellidos completos |

[Handwritten signatures and initials corresponding to the list above]

NOTA: El interesado deberá ponerse de acuerdo con el jurado para fijar fecha (día y hora) del examen, para evitar problemas de asistencia. ES IMPOR-
TANTE LA PUNTUALIDAD.

**" ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS EN SUSPENSIÓN DE
CELULAS DE MAIZ Var. VS-22 " .**

Agradecimientos:

A los héroes que con su apoyo incondicional me ayudaron todo el tiempo para lograr alcanzar esta meta, mis padres :

Modesto Román Jaramillo y Victoria González Reyes.

A todos mis hermanos que de alguna manera me ayudaron para realizar este recorrido por la vida del conocimiento ya que sin el apoyo y el ejemplo que siempre me brindaron no hubiera tenido un camino firme que seguir.

Por el hogar más hermoso que he podido habitar en este planeta por 27 años mi pequeño paraíso, un lugar lleno de árboles, lleno de paz. Un lugar donde siempre se respiró tranquilidad y mucho amor. La Escuela Primaria Guadalupe Victoria.

A Dios

Cuando yo tenía quince años le pedí que me ayudara a alcanzar esta meta y hoy este sueño se a hecho realidad.

Este trabajo fué realizado en el laboratorio de "Cultivo de Tejidos" del Departamento de Bioquímica; Facultad de Química. - UNAM.

Asesor del tema.

Dra. Estela Sanchez Quintanar.

Sustentante.

Eduardo Román González.

E.R.G. agradece el apoyo financiero de Conacyt a través de una beca durante el desarrollo de este trabajo.

Doy las gracias a todos los compañeros del laboratorio que me apoyaron en la realización de esta tesis. Al Departamento de Bioquímica y muy en especial a los compañeros del laboratorio de Cultivo de Tejidos.

INDICE.

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
FUNDAMENTACIÓN DEL TEMA.	4
Biología de Zea mays. Variedad V S-22	4
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	6
Hipotesis General	7
Objetivo General	7
Objetivos Particulares	7
ANTECEDENTES	8
Cultivos en suspensión	8
Evaluación del crecimiento de células en suspensión	9
Curva de crecimiento en un cultivo de células en suspensión	10
Morfología celular	11
Cultivos en suspensión de diferentes especies vegetales	11
MATERIAL Y METODO	15
Material biológico	15
Desinfestación del material Biológico	15
Medios de cultivo	16
Medios de inducción (R4)	17
Medios de Resiembra R2 y RD	17
Medio liquido base R2 1/2 y RD 1/2	19
Medios liquidos	19
Medio condicionado	20
Extractos Naturales	20
Extracto de callo	20
Extracto de embrión	20
Extracto de eje embrionario	21
Extracto de nódulo	21
PROCEDIMIENTO	21
Inducción del callo	22
Mantenimiento del callo por subcultivos	22
Establecimiento del cultivo primario en medio liquido	23
Segundo subcultivo	24
Evaluación del cultivo en suspensión	24

Peso seco	24
Paquete celular	24
Número de células por ml	25
RESULTADOS	26
Primer experimento	26
Citocininas	26
Compuestos naturales	28
Nutrientes inorgánicos (KH ₂ PO ₄)	29
Lote control	30
Segundo experimento	30
Bases nitrogenadas	33
Prolina	33
Asparagina	37
Presencia de inositol en el medio	37
Tejidos naturales como factores de crecimiento	38
DISCUSIÓN	42
Fitorreguladores	43
Nutrientes y vitaminas	44
Nitrógeno orgánico e inorgánico	45
Otros factores moduladores del crecimiento	47
Tejidos vegetales como factores de crecimiento	48
Conclusiones	50
BIBLIOGRAFIA.	52

Resumen

El presente trabajo consistió en establecer un medio de cultivo en suspensión de células de maíz de la variedad V S-22. La formación de callo se indujo a partir de embriones maduros de maíz. De este material se seleccionaron lotes de 40 gr. de callo para iniciar el cultivo en suspensión, en matraces de 1 litro. Posteriormente por centrifugación las células fueron separadas del medio, inoculando matraces de 250 ml con 45 ml de medio nuevo más 5 ml de medio condicionado.

La evaluación de los cultivos se realizó por medio de determinaciones de peso seco, paquete celular ó conteo de células.

Los factores que se utilizaron fueron dos citocininas, adenina y 2ip; compuestos inorgánicos KH_2PO_4 compuestos orgánicos, asparagina, prolina é inositol; Extractos, de eje, de embrión, de callo y cortes de nódulos primarios de maíz de cinco días de germinado Estos factores se probaron cada uno de manera independiente y en diferentes concentraciones.

Optimizando las concentraciones de los distintos factores de crecimiento logramos obtener un medio compuesto de RD 1/2 + Prolina 20 mM + Asparagina 14 mM + adenina 0.1 mg/l + 15 nódulos de maíz de 5 días de germinado, el cual respondió a las necesidades del cultivo permitiendo división celular y crecimiento.

Otro factor que se tomo en cuenta fue la presencia de inositol en el medio. Cuando no esta presente en el medio el cultivo tiende a morir rapidamente por lo que se concluye que el inositol tiene un papel relevante en el establecimiento de cultivos en suspensión.

También se probaron diferentes velocidades de agitación con el fin de mejorar la aereación y las características del cultivo, encontrando que 100 rpm de agitación es la velocidad más adecuada para este cultivo.

INTRODUCCIÓN.

Desde antes de la conquista el maíz ha sido el principal artículo de consumo en la alimentación del pueblo mexicano. Actualmente se cultiva en un 80% de nuestro territorio, con excepción de las cumbres más elevadas (Escobar, R. 1966).

Como alimento, el mexicano utiliza el grano de maíz para hacer tortillas, pan, atoles, pinole, tascalate, totopo, pozole. etc. siendo éstos, un pequeño ejemplo del uso que le dan algunos grupos étnicos en la República. (Meier, Helmut M. E. 1978).

La planta de maíz ha sido domesticada desde hace muchos años; Sin embargo, el conocimiento que se tiene de ella, es todavía muy escaso, ya que no se conoce con precisión los mecanismos involucrados en la regulación de los procesos fisiológicos y bioquímicos de esta planta.

El desarrollo tecnológico actual y el conocimiento científico están modificando los patrones de vida de los pueblos. Así, la biotecnología vegetal, es una nueva herramienta que pretende resolver problemas que actualmente preocupan no sólo a nuestro país, sino a todos los grupos que pueblan el orbe, tales como el desgaste de suelos agrícolas, la disminución de tierras de cultivo, la contaminación de los ecosistemas y el aumento de las poblaciones humanas

La biotecnología aplicada a los cultivos de células vegetales nos brinda varias ventajas, como el propagar plantas a partir de tejidos en crecimiento vegetativo, proveer de manera continua material vegetal para propagación y facilitar estudios sobre los constituyentes de las plantas. Estos estudios pueden darnos a conocer la biosíntesis de compuestos o de enzimas y los genes involucrados en la síntesis de metabolitos secundarios, de componentes volátiles y la regulación de la biosíntesis de estos compuestos,(Langezaal, Scheffer 1992).

Este trabajo pretende, con ayuda de la Técnica de cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) aportar nuevo conocimiento de esta planta a nivel celular, como también establecer nuevas bases para realizar futuras investigaciones en bioquímica y biología celular con mayor precisión.

FUNDAMENTACIÓN DEL TEMA.

Biología de Zea mays L. variedad V S-22.

Sistema de clasificación de Dahlgren et al, (1985).

Su ubicación taxonómica es la siguiente:

Reino	Vegetal
División	Antrophyta
Clase	Monocotyledonae
Superorden	Commeliniflorae
Orden	Poales
Familia	Poaceae
Subfamilia	Panicoidae
Género	<i>Zea</i>
Especie	<i>Zea mays</i>
Subespecie	sacharata (dulce)

El híbrido V S-22 es una variedad sintética, de polinización libre, presentando un ciclo semitardío y de alto rendimiento. Su período vegetativo es de 150 días, ocurriendo la floración a los 87 días y alcanzando una altura promedio de 2.80 m. y la inserción de la mazorca a los 1.50m, siendo ésta grande y gruesa, de forma cónica, con dentados de color blanco cremoso. Esta última característica tiene mayor importancia ya que las variedades blancas son las preferidas para hacer tortillas o atoles, así como forraje para animales, quienes las cuales prefieren a las de grano córneo o duro.

La variedad VS-22 utilizado en este estudio (ver metodología) permite obtener varios productos, como son: la harina de maíz, almidón, glucosa, aceite, etc. Este último, se purifica fácilmente y forma un líquido color ambar transparente y de sabor agradable. Su uso es muy variado; como alimento, para la lubricación de máquinas, para alumbrado y para la fabricación de jabones. La harina de maíz se usa principalmente para consumo humano haciendo con ella, tortillas, pan, atoles, totopo, pinole, tamales, etc.

Las citocininas a bajas concentraciones promueven división celular y además también intervienen en la síntesis de ácidos nucleicos existiendo a la vez una estrecha relación entre el metabolismo de los ácidos nucleicos y el crecimiento celular.

Los extractos naturales en ocasiones pueden dar mejores resultados que las auxinas y citocininas (Street, H. 1973) . Los tejidos según el tipo de regulador de crecimiento al que responden se dividen en 4 categorías: a) Aquellos que sólo requieren una auxina; b) Aquellos que requieren una citocinina; c) tejidos que requieren una auxina y una citocinina; d) y aquellos que solo responden a un medio con extractos naturales.

Para poder clasificar nuestro cultivo dentro de una de las cuatro categorías fué importante incluir, además de las auxinas y citocininas, los extractos naturales de maíz, ya que hasta el momento se desconoce qué otros factores de crecimiento puedan tener estos tejidos que estimulan los cultivos en suspensión.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Se sabe que:

En cultivo de tejidos, las diferentes especies o genotipos demandan diferentes condiciones nutricionales por lo que es importante añadir los ingredientes de manera acertada al medio de cultivo, particularmente minerales, aditivos orgánicos y carbohidratos.

"Las condiciones para establecer un cultivo en suspensión depende de las necesidades particulares del tipo de células que se deseen cultivar". (Streeth, et al 1966)
"Un buen cultivo celular es aquel en el cual en un lapso de tiempo corto podemos duplicar o triplicar el cultivo, y al momento de subcultivarlo, diluyéndolo más, se obtiene la misma proporción de crecimiento".

Las citocininas a bajas concentraciones promueven división celular y además también intervienen en la síntesis de ácidos nucleicos (Skoog et al. 1954) existiendo una estrecha relación entre el metabolismo de los ácidos nucleicos y el crecimiento celular.

Además de las auxinas y citocininas también los extractos naturales en ocasiones pueden dar mejores resultados (Street, H. 1973). Los tejidos vegetales según el tipo de fitoregulador de crecimiento al que respondan se dividen en 4 categorías:

a) Aquellos que sólo requieren una auxina; b) Aquellos que requieren una citocinina; c) tejidos que requieren de una auxina y una citocinina; d) y aquellos que sólo responden a un medio con extractos naturales.

Hipotesis General.

Tomando en cuenta estas experiencias previas se definio la siguiente hipotesis:

"El crecimiento de un cultivo de células en suspensión depende de las condiciones óptimas de nutrientes, hormonas y condiciones físicas del cultivo. Por lo tanto, si optimizamos las concentraciones adecuadas de nutrientes y hormonas involucradas en el crecimiento para células de maíz VS-22, podremos establecer un buen cultivo de células de maíz en suspensión".

Objetivo General:

"Establecer las condiciones físicas y biológicas óptimas para el establecimiento de un cultivo de células de maíz en suspensión".

Objetivos particulares

1.-Determinar la metodología adecuada, manipulación y selección de tejidos que permita establecer cultivos en suspensión de células de maíz.

2.-Identificar los fitorreguladores más adecuados que permitan establecer y mantener vivas este tipo de células.

3.-Determinar la influencia de diversos factores y nutrientes en la optimización y crecimiento del cultivo.

4.-Definir los parametros adecuados para medir el crecimiento de los cultivos a diferentes intervalos de tiempo

ANTECEDENTES.

Cultivos en suspensión.

La técnica de cultivo de tejidos in vitro consiste en cultivar órganos y células vegetales en medios nutritivos adecuados y en forma aséptica, entre ellos, podemos mencionar ápices de raíz, de tallo, primordios de hoja, primordios o partes inmaduras de flores, frutos inmaduros, órganos aislados, embriones inmaduros o maduros, segmentos de órganos de tallo, hojas y algunas veces ovarios, óvulos, anteras y polen, (Street, 1977).

Esta técnica, ha permitido abrir fuentes de investigación a nivel fisiológico y bioquímico, logrando conocer procesos metabólicos y de síntesis de muchas biomoléculas, como también ha permitido estudiar procesos tan complejos como la morfogénesis y la diferenciación celular, (Langezaal and Scheffer, 1992).

Una de las muchas alternativas que nos ofrece esta técnica, es la de los cultivos de células en suspensión. Estos, consisten en un conjunto de células aisladas así como de pequeños racimos celulares distribuidos en un medio líquido en constante movimiento, (Street, 1977).

La importancia de este sistema, consiste en la plasticidad que presenta, ya que permite realizar diversos trabajos de investigación como: embriogénesis, crecimiento y diferenciación celular (Gamborg, Constabel y Miller 1970), ciclo celular (King, 1980), genética molecular, (Ashmore y Gould, 1981), bioquímica y metabolismo (Tomas y Darey, 1975), así como la obtención de diversos productos secundarios (Langezaal & Scheffer, 1992).

Estos cultivos pueden establecerse a partir de un explante (mesófilo de hoja, fragmento de cotiledón u otro tejido). Sin embargo, en general el crecimiento en este tipo de sistema es muy lento. Otra manera de establecer un cultivo es a partir de un callo friable, el cual se lleva a un medio líquido en agitación. El cultivo en suspensión se establece después de un periodo de adaptación en el medio líquido para dar lugar a un cultivo apropiado en que exista un balance nutricional y el contenido hormonal adecuados (Dougall, 1980).

La composición del medio de cultivo y el constante movimiento del medio mediante agitación o burbujeo, son factores que influyen en el grado de dispersión de las células del tejido, dando como resultado unidades más pequeñas y ayudando al intercambio gaseoso.

Evaluación del crecimiento de células en suspensión.

El crecimiento de las células en un cultivo en suspensión puede evaluarse en forma cualitativa pues conforme las células se multiplican se observa un aumento en la turbidez del medio de cultivo, y un halo cada vez mas definido sobre la pared del matraz que lo contiene. Sin embargo, el crecimiento también se expresa cuantitativamente mediante la determinación periódica de parámetros específicos de crecimiento.

Para medir el crecimiento en un cultivo en suspensión se puede utilizar el número de células, la masa de las células, el volumen celular etc. Los diferentes métodos que se utilizan incluyen el conteo celular, la determinación de peso seco y peso fresco; que permite definir una curva de crecimiento. Estos métodos requieren de un gran número de matraces de cultivo y repeticiones en duplicado o triplicado a fin de obtener resultados confiables, (Langezaal and Sheffer, 1992).

Los parámetros más frecuentemente utilizados son:

a) El peso fresco y peso seco de las células cultivadas.

b) El número de células por unidad de volumen, cuantificadas con ayuda de una cámara de Neubauer.

c) El volumen total ocupado por las células en una alícuota del cultivo, cuando las células se compactan por centrifugación.

Curva de Crecimiento en un Cultivo de Células en Suspensión

Una curva de crecimiento de un cultivo, puede presentar cinco fases:

a) Reposo: b) Exponencial: c) lineal: d) estacionaria y e) disminución progresiva.

Durante la fase de reposo el inóculo no presenta ninguna señal de división (Dodds y Roberts, 1982) ya que únicamente se está adaptando a las nuevas condiciones nutricionales para dar lugar a la iniciación de la división celular la cual se acelera durante las fases exponencial y lineal del cultivo. Posteriormente la velocidad de división va disminuyendo gradualmente hasta dar inicio a la fase estacionaria, que se produce en el momento en que se agotan los nutrientes o al menos algunos de ellos. Durante esta fase el cultivo ha alcanzado su máxima densidad celular, (a partir de la cual ya no se presenta división celular). Por último la falta de nutrientes cuando ya no es suficiente para mantener a la población promueve que el cultivo sufra un decremento por lisis o destrucción celular dando inicio a la última fase, la disminución progresiva.

Morfología celular.

Los cultivos de células en suspensión generalmente son heterogéneos, con células aisladas y pequeños agregados celulares, la proporción entre ambos, así como su tamaño depende de la especie vegetal de la cual se ha derivado el cultivo, de la edad del tejido elegido como explante para iniciar el cultivo, del mínimo de resiembras del cultivo, de la composición del medio y de las condiciones ambientales.

Cultivos en suspensión de diferentes especies vegetales.

El cultivo en suspensión actualmente nos presenta un panorama de estudio amplio, como base para diferentes tipos de biotecnología; es por ello que no podemos dejar de mencionar a los investigadores pioneros, aquellos que iniciaron esta línea de estudio dentro de la ciencia.

Uno de los primeros trabajos donde se utilizó el cultivo de células en suspensión fue dirigido por Haberlant (1898), quien fue uno de los primeros en intentar aislar células de tres géneros de monocotiledoneas, *Erihronium*, *Ornithogalum* y *Tradescantia*.

Los resultados de estos estudios no fueron favorables ya que no se observó división celular en los cultivos. sin embargo le permitieron al autor reconocer que las células vegetales presentan totipotencia y que los siguientes trabajos deberían enfocarse en los factores que permiten o promueven la división celular para poder realizar posteriormente trabajos enfocados a la morfogénesis y regeneración.

White, (1934), trabajando con un cultivo de ápices de raíz de tomate (*Lycopersicon esculentum*) logró obtener en un medio líquido de sales inorgánicas y extracto de levadura, un cultivo celular que promovía la división celular y poco después encontró que el extracto de levadura podía ser sustituido por tres vitaminas del grupo B; tiamina; piridoxina y niacina.

Kameya y Hinata (1970), realizaron el primer cultivo de polen de angiosperma con granos de polen de diferentes especies de *Brassica*, para este estudio utilizaron un medio líquido que contenía de 10% al 15% de sacarosa, y 10% de leche de coco obteniendo colonias celulares pero no lograron regenerar plantas.

En 1970 Nagata y Takabe logran demostrar que los protoplastos obtenidos del mesófilo de la hoja de tabaco forman pared celular antes de dividirse y posteriormente forman agregados celulares.

Los protoplastos se pueden obtener de diversas formas, a partir del mesófilo de hoja como estos autores, utilizando enzimas que degraden la celulosa; Sin embargo por medio de cultivo de células en suspensión podemos tener poblaciones grandes, y adecuadas, de protoplastos ya que se conocen las condiciones que las mantienen vivas y se pueden mantener por grandes periodos de tiempo. Uchimiya y Murashige (1974) reportaron que las células que se mantuvieron en un cultivo por 14 días son más apropiadas para el aislamiento de protoplastos. Estudiaron la influencia de la concentración enzimática en protoplastos libres y descubrieron que el 1% celulasa R10' y el 0.2% de macerozima dan buenos resultados para el aislamiento.

Grambow, Kao, Miller y Gamborg (1972) encontraron que los protoplastos obtenidos de cultivos de células de zanahoria en suspensión (*Daucus carota* L.) tuvieron el potencial para la formación de embriones, los cuales crecieron y proliferaron,

obteniéndose plántulas a partir de ellos. Posteriormente, Eriksson, Bonnett, Glimelius y Wallin (1974) mencionan que el cultivo de protoplastos pueden producir etileno, el cual es considerado como un inhibidor de la división celular

Nadel, 1989. trabajo con cultivos en suspensión para estudiar la formación de embriones somáticos en cereales, en el cual observo que la adición de manitol en el medio líquido MS previene la lisis de las células e incrementa el número de embriones somáticos formados de *Apium graveolens* L., permitiendo así el estudio de la morfogénesis somática.

Horn, Martin y Widholm, 1992 han trabajado con cultivos en suspensión con células de sorgo, optimizando el medio de cultivo y las condiciones que requieren para obtener un cultivo fototrófico: para ello, probaron diferentes concentraciones de magnesio, fosfato y de nitrato de potasio y NH_4Cl . En cada caso se determino la concentración mas adecuada para este cultivo.

Sierra, Vanderheiden y Verpoorte, (1992). Reportaron la obtención y estabilidad de alcaloides producidos por cultivos en suspensión de *Tabernaemontana divaricata* en el cual la presencia de NAA y BAP en el medio promovió un incremento de biomasa y alcaloides.

Koyama, Ojima y Yamaya, 1992, estudiaron con células de zanahoria (*Daucus carota* L. cv. MS yonsun) la influencia del fosfato para promover el crecimiento en cultivos en suspensión, además, estudiaron el posible mecanismo metabólico y la utilización del P a nivel celular. Sus estudios demuestran que el fosfato puede ser un factor importante que influye de manera directamente proporcional sobre el crecimiento del cultivo.

Desde el punto de vista teórico se ha demostrado que la forma de esterilizar influye en el desarrollo de este tipo de cultivos. El uso del autoclave presenta algunos problemas ya que el medio es sometido a fuertes cambios de presión y temperatura que promueven una serie de reacciones de diferentes constituyentes de manera inevitable en este proceso Sawyer & Hsiao, (1992). encontraron que al esterilizar con autoclave el medio MS líquido se promueve la precipitación de algunos micronutrientes, por lo que recomiendan esterilizar de manera separada el FeNa-EDTA + KH_2PO_4 con lo cual se evita la precipitación de algunos micronutrientes como también CaCl_2 y KH_2PO_4 .

Otra reacción que promueve la esterilización por autoclave en el medio líquido es la hidrólisis de la sacarosa, dando como resultados una serie de compuestos perjudiciales para el cultivo ya que algunos de ellos se han reconocido como tóxicos biológicos,(Weatherhead et al 1978).

Watson, Fletcher & Russell, (1992.) realizan un trabajo con cultivos en suspensión evaluando el número y los cambios que sufren los organelos celulares. En este trabajo, ellos hicieron conteo de células, pared celular, núcleos, vacuolas, citoplasma, plastidios, mitocondrias, cuerpos lípidicos, aparato de golgi, encontrando que en los primeros días del cultivo los organelos celulares son abundantes y pequeños, conteniendo poco volumen. A los 15 días del cultivo, los organelos son pocos pero de mayor tamaño y volumen.

Masuda, Nakagawa & Sugawara, 1988, desarrollaron cultivos en suspensión de *Beta vulgaris*, estos autores probaron el uso de tejidos de hoja para inducir el crecimiento del cultivo, para ello, añadieron 15 fragmentos de hoja en un matraz de 50 ml con 10 ml de cultivo conteniendo el medio 0.25 mg/l de Ba y observan que el número de células del cultivo sí aumentó.

MATERIAL y METODO.

Material Biológico.

En este trabajo se utilizaron embriones maduros de maíz *Zea mays* L. de la variedad V S-22, (Semilla certificada de la Productora Nacional de Semilla, PRONASE)

La obtención de embriones se realizó manualmente con una navaja de bisturí, eliminando el endospermo, dejando completo el eje embrionario y el escutelo ya que éste favorece la formación del callo cuando se encuentra presente y en contacto con el medio de cultivo. (Radjevic, 1984; Armstrong y Green, 1985; Sánchez de Jiménez et al 1988). Para cada lote se necesitaron disectar 1600 embriones.

Desinfestación del Material Biológico.

Una vez aislados los embriones, se les sometió a un tratamiento de desinfestación Este consistió en hacer una solución de hipoclorito de sodio (cloralex) al 11% con 8 gotas de una solución de plata coloidal (microdine, solución germicida) y dos gotas de tween 20 ú 80 por 100 ml de solución.

Cien embriones de maíz se colocaron en un matraz estéril de 250ml al cual se le agregaron 50 ml. de la solución de hipoclorito, se llevó a agitación por un lapso de 11 minutos, al término del cual se retiró la solución y para eliminar totalmente el cloro se procedió a lavar los embriones durante 5 minutos tres veces utilizando agua estéril.

Medios de Cultivo.

Los medios de cultivo utilizados en este trabajo fueron: R4, R2, RD, R2 1/2, y RD1/2. Presentando sólo algunas ligeras modificaciones entre ellos.

Todos estos medios contienen los mismos componente y para facilitar su preparación se hicieron soluciones stock basándose en el medio MS, (ver cuadro 1).

Solución stock.	Compuesto	Cantidad (g/l).
A	CaCl ₂ ·2H ₂ O	44.0
B	NH ₄ NO ₃	16.5
	KNO ₃	19.0
C	KI	0.083
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0025
D	KH ₂ PO ₄	17.0
	H ₃ BO ₃	0.62
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.025
E	MgSO ₄ ·7H ₂ O	37.0
	MnSO ₄ ·H ₂ O	1.89
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0025
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.86
F	FeSO ₄ ·7H ₂ O	2.784
	EDTA·Na ₂	3.726
G	<i>myo-inositol.</i>	2.5
H	<i>Ac.nicotinico</i>	0.025
I	<i>Tiamina-HCl</i>	0.05
J	<i>Piridoxina-HCl</i>	0.025
K	<i>Glicina</i>	0.25

Cuadro 1.-Soluciones stock del medio de Murashige-Skoog,(1962).

El medio "R" consiste en una ligera modificación del medio MS (Murashige y Skoogs, 1962) en cuanto a la concentración final de nitrato de amonio (NH_4), nitrato de potasio (KNO_3) y tiamina, (Sánchez de Jiménez et al, 1988)

Todos los medios se ajustaron a un pH de 5.8 y en los medios sólidos se utilizó como gelificante gelrite 0.25% (sigma).

Medio de Inducción (R4)

Este medio es el que se utilizó para la inducción de callo a partir de embriones maduros de maíz (VS-22), agregando para un litro de medio las cantidades citadas en el cuadro 2 de las soluciones stock y conteniendo 4 mg/l de MCPP.

Todos los medios de cultivo se esterilizaron dividiendo los componentes de la solución stock. En el autoclave se esterilizaron todos los compuestos inorgánicos junto con la caseína y la sacarosa dejándolos 15 minutos a una presión de 1.2 kg/cm², los compuestos orgánicos que contienen los medios de cultivo, es decir las soluciones G,H,I,J,K, se esterilizaron por medio de filtración utilizando para ello, membranas milliporo esteriles. Finalmente se mezclaron todos los componentes del medio en un matríz.

Medios de Resiembra R2 y RD

Para preparar un litro de estos dos medios se añadió la misma cantidad de las soluciones stock que mencionamos para el medio de inducción. El medio R2 sólo difiere del medio R4 en la concentración de MCPP la cual es de 2 ppm más 0.01 ppm de cinetina.

El medio RD, solo difiere del R2 en los fitorreguladores utilizados. Aquí se usó como auxina 2,4-D, (ácido 2,4-dicloro-fenoxi-acético). a una concentración de 1 ppm y cinetina 0.05 ppm.

Cuadro 2: Medio "R" base. El tipo y concentración de hormona varían de acuerdo al medio en cuestión.

Solución stock.	cantidad ml/l.
A	10
B	50
C	10
D	10
E	10
F	10
G	10
H	5
I	5
J	5
K	2
Hidrolizado de caseína	200 mg/l.
Sacarosa	30 gr/l.
gelrite	2.5 gr/l.

Medio Líquido Base R₂ 1/2 y RD1/2.

Sabiendo que el medio "R" permite inducir y mantener callo de maíz de esta variedad, (Sánchez de Jiménez et al, 1988) se decidió utilizar el mismo medio ya conocido para establecer cultivos en suspensión y así añadir aquí los factores de crecimiento que se probaron.

A diferencia de los medios sólidos, estos medios presentan sólo la mitad de la concentración de las sales que contiene el medio "R". Esto se hizo para evitar la pérdida de células vivas por plasmólisis. La concentración de las vitaminas y compuestos orgánicos se mantuvo igual.

Medios Líquidos.

El primer medio líquido con el que se trabajó fue "R₂ 1/2" el cual contiene como fitorreguladores "MCP" en una concentración de 2 ppm y cinetina 0.01 ppm.

El medio "RD1/2" contiene como auxina, 2,4-D 1 ppm y cinetina 0.05 ppm. y como complemento del medio se utilizó adenina 0.1 ppm, prolina 20mM asparagina 14.1 mM y nudos primarios de maíz obtenidos de plántulas crecidas en condiciones estériles de 5 días de edad.

Medio Condicionado

El medio de cultivo usado, cuando es reutilizado en cultivos junto con medio nuevo se le llama medio condicionado. En este trabajo se utilizó medio condicionado en los cultivos en suspensión y en concentraciones que mencionaremos posteriormente.

Extractos Naturales.

Los extractos naturales utilizados en este trabajo fueron: Extracto de embrión maduro, extracto de eje embrionario, extracto de callo y extracto de nódulos.

Los extractos se obtuvieron de la siguiente manera:

Se prepararon 100 ml de buffer A, el cual se compone de KCl 50 mM; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 10 mM; B-etanol 5 mM; tris-HCl. 50 mM. y se llevó a un pH de 7.6.

Extracto de callo. Este se obtuvo pesando 2.5 gr. de callo de 2^o resiembra. y en un mortero se congelaron con nitrógeno líquido y se procedió a macerar inmediatamente hasta obtener un polvo fino. Se pasó entonces a un tubo de plástico al que se añadieron 7 ml de buffer A y se homogenizó con un politrón durante 15 seg, posteriormente se centrifugó a 15,000 rpm durante 30 minutos; rescatando finalmente el sobrenadante.

Extracto de embrión. Para este extracto se pusieron a germinar 100 semillas de maíz de la var V S-22 durante 24 hr, posteriormente se disectaron los embriones pesando 5 gr. de ellos y sometidos al proceso antes mencionado, utilizando 5 ml del buffer A. Utilizando el sobrenadante que se obtuvo al centrifugar.

Extracto de eje embrionario. Para obtener este extracto, se pusieron a germinar 100 semillas de maíz V S-22. Después de 24 hr. fueron disectados los ejes y pesados hasta obtener 0.5 gr de eje los cuales se sometieron al proceso antes mencionado utilizando 5 ml de buffer A.

Extracto de nódulo. Se pusieron a germinar embriones de maíz en medio MS sin hormonas y a los 5 días, se disectaron de los coleótilos 15 nódulos primarios a los cuales se les sometió al tratamiento mencionado anteriormente y se utilizó 5 ml de buffer A.

PROCEDIMIENTO

Este trabajo, se llevo a cabo en dos experimentos. El primer experimento se realizó utilizando como medio de mantenimiento del callo "R2" y el medio líquido en el cual se hicieron los tratamientos fue "R2 1/2". Los factores de crecimiento que se optimizaron fueron: dos citocininas; 2ip (2-aminoacilpurina) y adenina. Compuestos naturales; extracto de embrión, extracto de eje de embrión y extracto de callo. Y un compuesto inorgánico; H_2PO_4 . Todos ellos se probaron en un rango de concentración amplio para identificar así la concentración a la cual mejor responden.

El segundo experimento se utilizó como medio de mantenimiento de callo en la 3o resiembra el medio "RD" y como medio base en el cual se llevaron a cabo todos los tratamientos fue el medio "RD1/2". Los factores de crecimiento que se optimizaron fueron: Adenina; Compuestos inorgánicos: KH_2PO_4 ; bases nitrogenadas: prolina y asparagina incluyendo la velocidad de agitación; Presencia de inositol en el medio y la presencia de tejidos naturales: Nódulos de maíz y extractos de nódulos.

Inducción del callo.

Ya desinfectado el material biológico, se procedió a sembrar en una campana de flujo laminar. Para ésto, los embriones se colocaron en una caja petri de 9 cm. de diámetro, con ayuda de unas pinzas de disección previamente sumergidas en etanol y flameadas. Se colocaron cuatro embriones sobre el medio de cultivo R4 de tal forma que el eje embrionario quedara en contacto con el medio. Una vez sembrado el material biológico, se incubó en obscuridad constante a 25°C durante tres semanas.

La inducción de callo se realizó sembrando lotes de 400 frascos de cultivo, conteniendo un total de 1600 embriones por lote. El total de lotes utilizados para la realización de este trabajo fue de 24 lotes de material biológico.

Mantenimiento del callo por subcultivos.

El mantenimiento se realizó haciendo tres resiembras con 15 días de incubación entre cada una de ellas. En la primera resiembra por lo regular se realizó una selección del callo antes de llevarlo al medio nuevo. Esto se hace porque además de los callos también se pueden obtener raíces, tallos y hojas. Utilizando un bisturí y pinzas se procede a eliminar todo el tejido diferenciado que no es útil para nuestros fines, dejando solamente el callo, el cual sembraremos en el medio R2 1/2

Para la segunda resiembra se tomó el material biológico del tubo de siembra y se dividió colocándolo en dos tubos con medio nuevo. Esto se realizó con todo el material obtenido, con el fin de darle más nutrientes y espacio para que el callo creciera con rapidez, sembrándolo en medio R2 1/2

En la tercera resiembra, el callo se pasó al medio "RD" y sólo se dejó ocho días de incubación para después establecer los cultivos en suspensión.

Establecimiento del Cultivo Primario en Medio Líquido.

El establecimiento del cultivo se realizó de la siguiente manera:

En las ocasiones en que se utilizó el medio líquido R2 1/2 , el medio de mantenimiento del callo que se utilizó fue R2 en las tres resiembras ya mencionadas, dejando el callo 8 días en la tercera resiembra. Del callo obtenido se pesaron 40 gr. y se añadieron a un matraz de 1000 ml con 200 ml de medio líquido R2 1/2 disgregando el tejido, ahí permaneció en incubación 25°C en una plataforma de agitación a 100 rpm. y en oscuridad. "Estas condiciones de incubación de los cultivos en suspensión siempre fueron las mismas."

Pasados ocho días, la suspensión obtenida se filtró en mallas de 500 micras y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos ,formando así un paquete celular, eliminando el medio viejo, dejando solamente 24 ml de medio condicionado, para resuspender el cultivo hasta que estuviera homogéneo. De ahí, con la ayuda de pipetas estériles de 10ml se tomaron alícuotas de 8 ml con las cuales se inocularon 3 matraces de 125 ml con 18 ml de medio R2 1/2 adicionado de los compuestos que se quería probar: adenina 0.5 mg/l. ó con 2ip 0.1 mg/l. por lo que el volumen final fue de 26 ml de medio. La evaluación del crecimiento del cultivo se realizó por paquete celular.

Cuando se utilizó el medio de cultivo RD1/2 para el mantenimiento del callo se utilizó el medio R2 1/2 para las dos primeras resiembras, en la tercera resiembra el callo se paso a el medio de cultivo RD dejándolo 8 días Luego se pesaron 40 gr. de callo y se añadieron en un matraz de 1000 ml con 200 ml de medio líquido RD1/2 donde permanecieron 8 días en incubación en las condiciones mencionadas anteriormente. Posteriormente se subcultivó por centrifugación y al paquete obtenido sólo se le dejaron 5 ml de medio condicionado. Se le añadió medio nuevo para resuspender y se pasó a un

matraz de 250 ml con un volumen total de 45 ml de medio nuevo RD1/2 + 5 ml de medio condicionado.

La incubación fue de ocho días en las condiciones ya mencionadas.

Segundo subcultivo.

La suspensión celular se vertió en tres tubos de centrifuga y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos para posteriormente eliminar el sobrenadante dejando sólo 5 ml de medio condicionado. Con el contenido de cada tubo de centrifuga se inoculó un matraz de 125 ml con 20 ml de medio nuevo "RD1/2 con adenina 0.1 mg/l., prolina 20 mM, asparagina 14.1mM., y 15 nódulos de de 5 días de edad.

Se dejó 8 días en incubación y se realizó un tercer subcultivo con el mismo medio para ser evaluado.

Evaluación del cultivo en suspensión.

Para evaluar el crecimiento del cultivo, se tomaron muestras de 5 ml con pipetas de 5 ml estériles, las muestras fueron vaciados en tubos de ensaye de 5 ml.

Peso seco. 4 ml de la muestra se utilizaron para evaluar el peso seco para lo cual se utilizaron papel filtro previamente pesados en una balanza analitica se les, adicono 4 ml de la muestra del cultivo y se llevaron los papeles con las células a un horno a 60°C durante 24 hr para su secado. Posteriormente se se pesaron en la balanza obteniendo asi el peso seco.

Paquete celular. Utilizando capilares de 100 microlitros, con un marcador se determino 5 cm. de longitud. llenando los capilares hasta la medida con el ml de muestra de cultivo. Los capilares se sellaban por la base con plastilina y se centrifugaron a 2000

rpm durante 10 minutos obteniendo así el paquete celular el cual se evaluaba midiendo la con una regla la longitud del paquete celular.

Las muestras para evaluar el crecimiento se tomaron al momento de establecer el cultivo, a los 5 y a los 10 días.

Número de células por ml. Se utilizó la cámara de Neubauer y con un capilar con muestra del cultivo se llenaron las dos cámaras para realizar el conteo celular. Se tomaron en cuenta cuatro campos al azar, utilizando un microscopio Carl's Zeiss standard se realizó el conteo sacando finalmente un promedio y desviación estándar.

La fórmula para obtener el número de células por ml. es: $N \times 10^4$

Donde N=número de células contadas en cada campo.

RESULTADOS.

Primer experimento.

En el medio líquido "R2 1/2" optimizaron las concentraciones de los factores de crecimiento estableciendo 4 diferentes concentraciones de adenina, 2ip, extracto de callo (e de c.) y dos concentraciones de fosfato. Como control se utilizó el medio de cultivo sin ningún factor de crecimiento.

La evaluación se realizó midiendo paquete celular. Obteniendo los siguientes resultados. (tabla 1).

Citocininas.

Tabla 1.-Efecto de la concentración de adenina.

paquete celular promedio (cm.)+desviación estandard.

Tiempo concentración de adenina (mg/l.)

Días	0.1	0.5	2.0	10.0
0	0.45+/-0.08	0.6+/-0.07	0.4+/-0.08	0.52+/-0.04
5	0.4+/-0.05	0.5+/-0.16	0.45+/-0.08	0.5+/-0.07
10	0.75+/-0.10	0.83+/-0.04	0.66+/-0.04	0.7+/-0.04
15	0.77+/-0.043	0.9+/-0.04	0.68+/-0.07	0.6+/-0.07
pendiente (m).	0.024	0.026	0.015	0.015

De esta tabla de resultados se observa que los cultivos que contenían adenina 0.5 mg/l fueron los que tuvieron un mayor crecimiento en comparación con los demás, por lo que podemos deducir que la concentración óptima para obtener un crecimiento de este cultivo con adenina se encuentra probablemente entre 0.1 y 0.5 mg/l.

Es por ello que se decidió reducir los intervalos de concentración del experimento anterior de forma que nos aproximáramos a las concentraciones más adecuadas. Por lo

que se probaron cultivos con concentraciones de adenina entre 0.05 mg/l, 0.1 mg/l, 0.2 mg/l, y 0.5 mg/l. Este cultivo se realizó de igual manera que el anterior, sólo se modificó el período de tiempo del cultivo, este nuevo lote se le dió un tiempo de incubación de 10 días.

En este lote pudimos observar que la concentración mas adecuada de adenina fue 0.5 mg/l ya que en este cultivo se obtuvo una tasa de crecimiento ligeramente mayor que los demás cultivos.

Para 2ip, los resultados obtenidos en los primeros experimentos fueron los siguientes (tabla 2).

Tabla 2.- Efecto de la concentración de 2ip.

Paquete celular, promedio (cm) \pm desviación estandar. (δ)

Tiempo concentraciones de 2ip (mg/l).

Días	0.02	0.1	0.5	2.0
0	0.4 \pm 0.01	0.45 \pm 0.04	0.46 \pm 0.047	0.5 \pm 0.01
5	0.36 \pm 0.1	0.4 \pm 0.04	0.45 \pm 0.1	0.36 \pm 0.012
10	0.76 \pm 0.1	0.7 \pm 0.16	0.62 \pm 0.20	0.86 \pm 0.047
15	0.47 \pm 0.04	0.75 \pm 0.10	0.62 \pm 0.043	0.57 \pm 0.043
pendiente (m)	0.024	0.023	0.011	0.033

En esta tabla podemos observar que hay incremento del paquete celular hasta los 10 días, y a los 15 días, por lo menos dos cultivos decrecen, 1 se mantiene estable y sólo uno crece un poco más.

Aun cuando se observó incremento en los cuatro cultivos, los primeros tres, los que contienen 2ip 0.02, 0.1 y 0.5 mg/l presentan un incremento más estable. Es por ello, que se propuso poner 4 nuevos cultivos con concentraciones de 2ip alrededor de esas concentraciones de acuerdo con la tabla 3.

Los resultados fueron los siguientes.

Tabla 3.- Efecto de la concentración de 2ip .
paquete celular promedio (cm) + desviación estandar (σ).
concentración de 2ip (mg/l).

Tiempo	concentración de 2ip (mg/l).			
Días	0.02	0.05	0.1	0.3
0	0.61+/-0.08	0.6+/-0.08	0.57+/-0.17	0.6+/-0.1
5	0.63+/-0.07	0.77+/-0.07	0.66+/-0.08	0.6+/-0.01
10	0.6+/-0.07	0.72+/-0.08	0.67+/-0.08	0.6+/-0.1
pendiente (m)	0.003	0.017.	0.01	0

Estos resultados muestran que las mejores opciones son 2ip 0.05 y 0.1 mg/l. ya que son los cultivos donde obtuvimos crecimiento. Sin embargo, el mejor cultivo que se observa es aquel donde hay crecimiento a los 5 y a los 10 días el cual es 2ip 0.1 mg/l.

Compuestos naturales

Extrato de callo: Con este factor se trabajó en las mismas condiciones que las citocininas ya mencionadas, Las primeras concentraciones en las se trabajó, se mencionan en la tabla no. 1 y los resultados de la primera etapa son mostrados en la tabla 4:

Tabla 4.-Efecto de las concentraciones de extracto de callo.

Tiempo	concentración del extracto (ml/l) paquete celular promedio + desviación estandar (σ).			
Días	0.02mg/l	0.1mg/l	0.5mg/l	1.0mg/l
0	0.4+/-0.07	0.47+/-0.043	0.45+/-0.05	0.55+/-0.05
5	0.4+/-0.07	0.4+/-0.05	0.33+/-0.05	0.47+/-0.04
10	0.7+/-0.07	0.72+/-0.21	0.62+/-0.04	0.55+/-0.05
15	0.7+/-0.07	0.72+/-0.043	0.67+/-0.04	-----
pendiente (m)	0.02	0.016	0.22	0.005

Los mejores resultados obtenidos oscilan alrededor de 0.02, 0.1 y 0.5 mg/l del extracto, por ello en el siguiente cultivo se propusieron concentraciones más cercanas a las anteriores, de acuerdo con el siguiente cuadro. (tabla 5).

Tabla 5.-Efecto de la concentración del extracto de callo.

tiempo	concentración del extracto. (ml/l).		
	paquete celular promedio (cm). + desviación estandar (δ).		
Días	0.02	0.1	0.3
0	0.6+/-0.03	0.57+/-0.05	0.66+/-0.04
5	0.7+/-0.01	0.76+/-0.05	0.66+/-0.04
10	0.65+/-0.05	0.75+/-0.05	0.5+/-0.08
pendiente (m)	0.01	0.019	0

En la tabla se observa que el cultivo donde se obtuvo un mayor crecimiento fue en la concentración de 0.1 ml/l de extracto, en los resultados obtenidos por días como en la pendiente.

Nutrientes inorgánicos (KH_2PO_4)

KH_2PO_4 es una sal que colabora con un grupo fosfato, el cual representa gran importancia para el metabolismo celular, ya sea para la síntesis de los ácidos nucleicos como también para la síntesis de la molécula de ATP. (Koyama, Ojima y Yamaya 1992).

Se probaron dos concentraciones diferentes de fosfato. 340 y 680 mg/l de KH_2PO_4 como también se indica en la tabla no. 6 Estos cultivos se trabajaron de igual manera que los cultivos de adenina, 2ip y extracto de callo.

Los resultados de esta primera etapa se encuentran reportados en la tabla 6.

Tabla 6.- Efecto de la concentración de KH_2PO_4

concentración de KH_2PO_4 (mg/l).

Tiempo	Paquete celular promedio (cm) + (σ).	
Días	340mg/l	680mg/l
0	0.4+/-0.1	0.5+/-0.01
5	0.5+/-0.1	0.46+/-0.23
10	0.3+/-0.18	0.66+/-0.14
15	0.35+/-0.05	0.82+/-0.08
Pendiente (m).	0	0.021

La tabla muestra que la mejor concentración de fosfato fue el cultivo que contenía 680 mg/l observándose un aumento en el crecimiento a los 10 y 15 días.

Lote control

Del experimento anterior se utilizó un lote con cultivos a los cuales no se les adicionó ningún factor de crecimiento utilizándolos como cultivo control. Dando los siguientes resultados tabla 7.

Tabla 7.-Medio control. R2 1/2.

Tiempo días	Paquete celular promedio. (cm \pm desviación estandar).
0	0.54+/-0.139
5	0.43+/-0.092
10	0.59+/-0.065

Segundo Experimento.

En éste, se realizaron las siguientes modificaciones: La inducción y las primeras dos resiembras, se hicieron igual que en los experimentos anteriores. En la tercera resiembra se sustituyó el MCPP por 2-4, D (1 mg/l) y se aumentó la concentración de

cinetina 5 veces, quedando esta a 0.05 mg/l. Llamando a este medio "RD". Y al pasar al medio líquido se realizó la misma modificación, (Medio "RD 1/2").

Con esta modificación se pretendió obtener un cultivo más homogéneo, células pequeñas y redondas, posiblemente más susceptibles de responder de manera positiva al añadir un factor de crecimiento en el cultivo.

Basándose en los resultados del experimento anterior, se establecieron tres cultivos, dos con 0.1 mg/l de adenina durante 4 subcultivos y un control. Para obtener resultados más exactos se decidió realizar las siguientes evaluaciones: Peso seco; Numero de células por ml y paquete celular. Tomando las muestras al tiempo cero, a los cinco y 10 días (tabla 8).

Tabla 8.- Efecto de adenina 0.1 mg/l en el medio "RD1/2".

Tiempo días	Peso seco (gr.)	No. de células ($\times 10^4 = \text{cel/ml}$)	Paquete celular (cm)
0	0.052	68 \pm -6.5	1.0 \pm -0.047
5	0.061	63 \pm -10.61	1.0 \pm -0.012
10	0.113	101 \pm -18.3	0.9 \pm -0.042

La tabla 8 muestra que el peso seco tuvo un incremento, al igual que en el número de células también podemos hablar de que el cultivo se encuentra creciendo. Y por último observamos que en paquete celular los resultados no muestran este efecto. Lo que puede suceder es que la técnica para realizar las evaluaciones no son igualmente sensibles y paquete celular y peso seco son menos sensibles en comparación con la forma de evaluar por número de células.

Al cambiar el medio base adenina tuvo que optimizarse nuevamente para el medio "RD1/2, así también se decidió poner nuevos cultivos con distintas concentraciones de fosfato de tal manera que adecuáramos el fosfato a las nuevas condiciones.

Los cultivos que se manejaron fueron los siguientes:

1.-RD1/2 + KH₂PO₄ 510 mg/l.

2.-RD1/2 + KH₂PO₄ 680 mg/l.

Los resultados del cultivo se encuentran en la tabla no. 9.

Tabla 9.-Efecto de la concentración de KH₂PO₄ 510 mg/l en medio RD1/2.

Tiempo días	Peso seco (gr.)	No. de células ($\times 10^4$ cel/ml $\pm \sigma$)	Paquete celular. (cm $\pm \sigma$)
0	0.085	63.5+/-6.57	0.8+/-0.012
5	0.107	-----	-----
10	0.092	82.5+/-7.5	1.1+/-0.047

Como podemos observar los resultados en esta concentración de fosfato fué satisfactorio, ya que encontramos valores mayores al final de cada evaluación, sin embargo faltaria conocer los resultados del medio que contiene fosfato a 680 mg/l para ya determinar cual es la concentración más adecuada para el cultivo, estos resultados se reportan o muestran en la tabla 10.

Tabla 10- Efecto de la concentración de KH₂PO₄ 680mg/l en medio RD1/2.

Tiempo días	Peso seco. (gr.)	No. de células ($\times 10^4$ cel/ml $\pm \sigma$)	Paquete celular. (cm $\pm \sigma$)
0	0.081	60+/-4.6	1.0+/-0.12
5	0.092	68+/-13	0.86+/-0.054
10	0.092	100+/-8.3	1.01/-0.042

Si observamos la evaluación de número de células, en comparación con el anterior se obtiene un incremento alto, sin embargo, la evaluación con peso seco y paquete celular no apoyan tanto para decir que el cultivo creció, por tanto podríamos decir que los resultados de la tabla 9 indican mejor crecimiento del cultivo. El medio RD1/2 con

KH_2PO_4 a 510 mg/l la concentración mas adecuada para establecer un cultivo en suspensión.

Bases Nitrogenadas.

Prolina:

Con base en los resultados obtenidos anteriormente , se pensó en la posibilidad de incluir dos factores en el mismo medio, la adenina que dio resultados positivos y la prolina. <para ello se buscó, bajo las nuevas condiciones la concentración óptima de este compuesto ya que podría no ser la misma, como ocurrió cuando añadimos por primera vez adenina al medio RD1/2, y tuvimos que optimizarla para este medio. Para esto se propusieron las siguientes concentraciones.

1.-RD1/2 + adenina 0.1 mg/l + prolina 20 mM.

2.-RD1/2 + adenina 0.1 mg/l + prolina 40 mM.

3.-RD1/2 + adenina 0.1 mg/l + prolina 60 mM.

4.-RD1/2 + adenina 0.2 mg/l + prolina 20 mM.

5.-RD1/2 + adenina 0.4 mg/l + prolina 20 mM.

En este experimento se modificó la velocidad de agitación, esperando con ello obtener un cultivo con mayor homogeneidad y una tasa de crecimiento mayor. Así en lugar de 100 rpm se usó 42 rpm.

Verificando así si una agitación menor seria más adecuada.

Tabla.-11.-Efecto de la concentración de adenina 0.1 mg/l + prolina 20mM en un cultivo en suspensión con medio RD1/2 y agitándose a una velocidad de 42 rpm.

Tiempo días	Peso seco (gr.)	No. de células x10 ⁴ cel/ml	Paquete celular. (cm.)
0	0.104	29.5+/-8.3	1.0+/-0.094
5	0.092	31+/-5.5	1.0+/-0.094
10	0.083	40+/-3.9	1.3+/-0.094

Tabla 12.- Efectos de la concentración de adenina 0.1mg/l + prolina 40 mM en un cultivo en suspensión con medio RD1/2 y agitándose a una velocidad de 42 rpm.

Tiempo días	Peso seco (gr.)	No. de células x10 ⁴ cel/ml.	Paquete celular. (cm.)
0	0.115	53+/-9.5	1.3+/-0.12
5	0.101	34.5+/-3.2	1.2+/-0.081
10	0.091	56.25+/-14.9	1.2+/-0.097

Tabla 13.- Efecto de la concentración de adenina 0.1 mg/l + prolina 60 mM en un cultivo en suspensión con medio RD1/2 y agitándose a una velocidad de 42 rpm.

Tiempo días	Peso seco (gr.)	No. de células x10 ⁴ cel/ml	Paquete celular. (cm.)
0	0.106	37.25+/-10.9	1.2+/-0.049
5	0.096	34.5+/-40	1.0+/-0.094
10	0.089	39.25+/-8.1	1.2+/-0.17

Este medio tampoco presenta las condiciones que se requiere ya que el cultivo sólo logro conservarse sin tener indicios de incremento de la población.

Hasta ahora sólo se han presentado los resultados de los medios donde se modificó la concentración de prolina, A continuación se muestran los resultados con las concentraciones modificadas de adenina. tabla 14 y 15.

Tabla 14.-Efecto de la concentración de adenina 0.2 mg/l + prolina 20 mM en un cultivo en suspensión con medio RD1/2 y agitándose a una velocidad de 42 rpm.

Tiempo días	Peso seco gr.	No. de células $\times 10^4$ cel/ml + (σ)	Paquete celular cm + (σ).
0	0.108	35+/-6.12	1.3+/-0.047
5	0.098	42+/-3.1	1.2+/-0.094
10	0.093	52.75+/-11.45	1.1+/-0.047

Como vemos en la tabla anterior en peso seco se observa un decremento del cultivo, en el conteo celular, vemos un pequeño aumento de la población celular. Pero la evaluación de paquete celular nos indica que el cultivo disminuyó. Sin embargo nos hemos apoyado en la evaluación del conteo de células por ser la prueba más sensible de las tres evaluaciones.

Tabla 15.-Efecto de la concentración de adenina 0.4 mg/l + prolina 20 mM en un cultivo en suspensión con medio RD1/2 y agitándose a una velocidad de 42 rpm.

Tiempo días	No. de células $\times 10^4$ cel/ml + (σ)	Paquete celular (cm.) + (σ)
0	37.25+/-2.6	1.0+/-0.047
5	37.25+/-10.5	1.3+/-0.047
10	31.5+/-2.9	1.1+/-0.042

De estos experimentos se puede considerar que las concentraciones más adecuadas están en el rango de los medios que contiene adenina 0.1 mg/l y prolina 20 mM , y el cultivo que contenía adenina 0.2 mg/l y prolina 20 mM. En estos dos medios se observó un incremento del cultivo, en base a la cuenta del número de células que es el parámetro más confiable ya que cambios en otros factores como el tamaño de la célula o el contenido de elementos de reserva pueden alterar el paquete celular o el peso seco.

Una vez ya estandarizada las condiciones del cultivo y optimizada las concentraciones de adenina y prolina, se decidió utilizarlos dentro del medio base y con ellos probar otras nuevas condiciones. Quedando el medio base de la siguiente manera:

Medio base: RD1/2 + adenina 0.1 mg/l + prolina 20 mM.

Para comprobar estos resultados y saber con claridad el efecto de la velocidad de la agitación en el cultivo, se reprodujeron los experimentos a dos velocidades de agitación diferentes. Se pusieron dos lotes iguales en distintas condiciones de agitación, uno a 20 rpm y el otro a 100 rpm. Se utilizó un cultivo control en cada lote y tres cultivos que contenían el medio RD1/2 + adenina 0.1mg/l + prolina. Dando los siguientes resultados promedio. (tabla 16).

Tabla 16.-Efecto de las condiciones de agitación a 20 rpm en un cultivo en suspensión utilizando como medio RD1/2 + adenina 0.1 mg/l + prolina 20 mM.

Tiempo días ^o	Peso seco (gr.)	No. de células $\times 10^4$ cel/ml + (σ).	Paquete celular. (cm.) + (σ)
0	0.104	59.5+/-5	0.68+/-0.047
5	0.090	64.3+/-5.8	0.73+/-0.028
10	0.102	85+/-8.9	0.78+/-0.042

En la tabla 16 se puede observar que el cultivo muestra un incremento celular a los 10 días, estos resultados nos indican que el medio es adecuado para permitir crecimiento celular. Por otra parte la agitación fue muy baja, aun así hubo respuesta del cultivo, lo que nos indica que no requerimos de una agitación muy alta como la hemos estado manejando para permitir una oxigenación adecuada del medio. Sin embargo, era importante conocer los resultados obtenidos con el mismo medio pero con agitación de 100 rpm. ver tabla 17.

Tabla 17- Efecto de la agitación a 100 rpm en un cultivo en suspensión utilizando el medio RD1/2 + adenina 0.1 mg/l + prolina 20 mM.

Tiempo días	No. de células $\times 10^4$ cel/ml + (σ).	Paquete celular (cm.) + (σ)
0	48+/-2.8	0.9+/-0.029
5	58+/-5.7	1.0+/-0.113
10	79.3+/-10.5	1.1+/-0.031

Los resultados de la tabla 17 permiten verificar que el medio utilizado apoya el crecimiento celular ya que encontramos resultados favorables al obtener un importante incremento del cultivo. A la vez la velocidad de agitación parece no ser un factor definitivo dentro del rango que se probó, sin embargo, la 2o velocidad probada permitió tener un cultivo con un mayor número relativo de células libres, por lo que se concluye que 100 rpm es mejor sistema para mantener las células de maíz en crecimiento.

Asparagina

Tabla 18.-Efecto de la concentración de asparagina 14.0 mM en un cultivo en suspensión con medio RD1/2 + adenina 0.1 mg/l + prolina 20 mM.

Tiempo días	Peso seco (gr.)	No. de células $\times 10^4$ cel/ml + (σ)	Paquete celular (cm.) + (σ)
0	0.103	51+/-9	1.3+/-0.047
5	0.092	73.1+/-16.7	1.3+/-0.042
10	0.093	63+/-10.4	1.2+/-0.047

De este cultivo pudimos observar que aunque la diferencia entre el número inicial y el número final de células obtenido no fue significativo, pero si existe una diferencia por lo que suponemos que la asparagina es un factor importante en este tipo de cultivos.

Presencia de inositol en el medio

Uno de los elementos orgánicos que se utilizan dentro del medio base es el inositol. Para determinar si este elemento es importante en el establecimiento de cultivos en

suspensión se decidió, poner un cultivo con el último medio mencionado antes, eliminando del medio base la presencia de inositol. Obteniendo los siguientes resultados de la tabla 19.

Tabla 19.- Efecto de la ausencia de inositol en un cultivo en suspensión.

Tiempo días	Peso seco (gr.)	No. de células $\times 10^4$ cel/ml + (σ).	Paquete celular. (cm.) + (σ)
0	0.127	74+/-14.7	1.4+/-0.047
5	0.094	74+/-18.3	1.3+/-0.047
10	0.077	-----	1.3+/-0.042

Los resultados obtenidos, muestran que el cultivo no creció, pero a la vez, el cultivo presentaba características poco saludables, con un color café un poco oscuro, lo que nos indicaba que el inositol es un componente importante para poder establecer un cultivo sano.

Tejidos Naturales como Factores de Crecimiento.

En ocasiones, el uso de tejidos enteros, o extractos de tejidos, dan mejores resultados en estimular el crecimiento de los cultivos en suspensión que cualquier otro compuesto, es por ello que se decidió probar con un tejido en crecimiento. Se usaron cortes de nódulos primarios obtenidos a partir de plántulas provenientes de embriones puestos a germinar en medio de cultivo sólido sin hormonas durante 5 días de incubación. Los nódulos se disectaron y se llevaron directamente a los medios de cultivo, poniendo 15 nódulos por matraz. Dando un subcultivo posteriormente para luego empezar a evaluar el cultivo. Se utilizó como medio base : RD1/2 + adenina 0.1mg/l + prolina 20mM. Los resultados se muestran en la tabla 20.

Tabla 20.- Efecto de la presencia de nódulos en un cultivo en suspensión.

Tiempo días	No. de células $\times 10^4$ cel/ml + (σ)	Paquete celular. (cm.) + (σ)
0	60.6+/-9.1	0.56+/-0.012
5	67.4+/-7.6	0.63+/-0.014
10	98.3+/-15	0.83+/-0.016

Como podemos ver en la tabla 20, el paquete celular y el número de células tienen datos que se comportan de manera similar, con lo que se apoyan para decir que el cultivo si respondió al estímulo agregado al medio. Para corroborar los resultados anteriores se decidió hacer un lote con las mismas condiciones y verificar los resultados obtenidos. (tabla 21).

Tabla.-21 Efecto de la presencia de nódulos en cultivos de células en suspensión:

Tiempo días	No. de células $\times 10^4$ cel/ml + (σ)	Paquete celular. (cm.) + (σ)
0	50+/-9.6	0.76+/-0.09
5	64.6+/-15.5	0.73+/-0.09
10	78.4+/-10.7	0.8+/-0.08

Aun cuando no se comportó de manera exacta el crecimiento del cultivo fue muy parecido, tanto utilizando paquete celular, como número de células. Hay que considerar, sin embargo, que estos últimos cultivos estuvieron con nódulos que tuvieron un subcultivo antes de comenzar a evaluar, por lo que pensamos que tal vez si se ponen nódulos nuevos en cada subcultivo el crecimiento celular podría ser mayor.

Es por ello que se decidió montar un nuevo lote con seis cultivos, todos con nódulos, pero al momento del subcultivo solo tres permanecieron con los mismos nódulos y los otros tres cultivos se les cambiarían por nódulos nuevos.

La evaluación se realizó con conteo celular y paquete de células, a los 0, 5 y 10 días del 2o subcultivo, dando los siguientes resultados. (tabla 22 y 23).

Tabla 22.- Efecto de la presencia de nódulos sin cambiar en un cultivo de células en suspensión con el medio RD1/2 + adenina 0.1 mg/l + prolina 20 mM.

Tiempo días	No. de células $\times 10^4$ cel/ml + (σ).	Paquete celular. (cm.) + (σ)
0	37.8+/-4	0.5+/-0.014
5	41+/-12	0.5+/-0.012
10	50.6+/-6.5	0.46+/-0.018

De los resultados de la tabla 22 observamos que el crecimiento celular no fue muy alto, sin embargo, se observa un incremento de la población celular,

Tabla 23-Efecto de la presencia de nódulos nuevos en un cultivo de células en suspensión.

Tiempo días	No. de células $\times 10^4$ cel/ml + (σ).	paquete celular. (cm.) + (σ)
0	38.25+/-6.5	0.5+/-0.014
5	57.5+/-8.5	0.7+/-0.012
10	54+/-7.3	0.6+/-0.023

Los resultados obtenidos en la tabla 23 nos muestran que el efecto en términos generales es el mismo, sin embargo debe notarse un ligero incremento en el de nódulos nuevos: La diferencia de crecimiento no fue muy alta, sin embargo, se sugiere que se utilizara siempre nódulos nuevos en cada subcultivo, ya que fue donde se obtuvo la mayor tasa de crecimiento tanto en base a número de células como de paquete celular.

Otra de las preguntas que nos inquietaron fue si obtendríamos resultados parecidos o mejores si en lugar de utilizar nódulos, utilizabamos un extracto de nódulos.

Para saber si los nódulos estaban contribuyendo con células al cultivo se decidió poner un nuevo cultivo con todas las mismas condiciones a las utilizadas con los nódulos, sólo que en esta ocasión se utilizó extracto de nódulos.(tabla 24).

Tabla 24.-Efecto del uso de extracto de nódulos como un factor de crecimiento en un cultivo en suspensión.

Tiempo	No. de células	Paquete celular
Días	$\times 10^4$ cel/ml + (σ).	(cm.) + (σ)
0	44+/-7	0.55+/-0.012
3	32+/-9	0.76+/-0.017
6	46+/-6	0.7+/-0.016
9	48.75+/-8	0.8+/-0.014
12	55+/-12	0.83+/-0.016

Los resultados que podemos observar en la tabla nos muestran un claro crecimiento, lo que significa que el extracto de nódulos también puede ser utilizado, y obtener resultados similares que al adicionar el tejido. Esto indica también que los nódulos no parecen estar contribuyendo con células al cultivo.

DISCUSIÓN.

Uno de los factores limitantes para establecer un cultivo en suspensión es el tipo celular del que se parta. Se ha observado que según el tipo de células que se desee trabajar, se requiere de un medio de cultivo y condiciones de cultivo específicos; de esta forma establecer el cultivo in vitro de cualquier planta requiere de un proceso largo en el cual, utilizando la técnica de ensayo y error, podremos encontrar las condiciones específicas para obtener un sistema adecuado, primero en callo y después en cultivo en suspensión con un alto rendimiento. Sin embargo, no todas las plantas presentan el mismo nivel de dificultad, tal es el caso de las dicotiledoneas que no son muy exigentes en los contenidos del medio de cultivo y se puede aplicar, a diferentes géneros, condiciones semejantes de cultivo. Los trabajos que se han realizado en monocotiledoneas, por el contrario han revelado que existe cierta dificultad en conseguir un buen sistema de cultivo, por lo que son consideradas plantas poco accesibles para someterlas a estas metodologías.

Por otro lado es importante reconocer que las condiciones de nutrientes, vitaminas y fitorreguladores que se utilizan en el sistema de cultivo sólido no son necesariamente las mismas condiciones que requiere el sistema de cultivo en suspensión, ya que el ambiente que rodea a las células es totalmente distinto.

Es por ello, que el presente trabajo se inició probando diferentes factores de crecimiento y en distintas concentraciones, con la meta de encontrar las mejores condiciones para el cultivo in vitro de células de maíz en suspensión.

Fitorreguladores:

Entre los factores involucrados en el crecimiento de los cultivos de células en suspensión, los fitorreguladores u hormonas reguladoras de crecimiento son de primordial importancia. Como vimos en el primer experimento se utilizaron dos hormonas en el medio base: MCPP 2mg/l y cinetina 0.01 mg/l. En estos cultivos pudimos observar que, en las evaluaciones hechas por medio de paquete celular, se observa un incremento en los cultivos donde lo aplicamos. Por medio de las observaciones microscópicas nos percatamos que el tipo celular de estos cultivos fué de mayor tamaño siendo por ello que al momento de evaluar utilizándose el paquete celular como indicador, el resultado de la evaluación es sensible a este parámetro y permitió saber fácilmente si había crecimiento o no.

En el 2o experimento se utilizaron como fitorreguladores en el medio base 2-4D (1 mg/l) y cinetina (0.05 mg/l). este cambio modificó las características de las células del cultivo encontrando en el microscopio que se trataba de células más pequeñas, debido posiblemente a la disminución de la auxina y al aumento de la citocinina, la cual fue 5 veces mayor.

Bajo estas condiciones la técnica de evaluación del crecimiento de medida del paquete celular ya no fué lo suficientemente sensible para medir crecimiento en el cultivo debido al tamaño celular. Por ejemplo, las células del cultivo del primer experimento eran tan grandes como el campo de observación utilizando 180x de aumento, siendo aproximadamente de 100 a 150 micras y las células del 2o experimento eran pequeñas: entre 30 a 60 micras.

Estos resultados indican que en la selección de los parámetros para medir velocidad de crecimiento de un cultivo de células, deben tenerse en cuenta las características del mismo y seleccionar con ese criterio el método más adecuado para ese cultivo. Asimismo es recomendable usar simultáneamente más de un procedimiento para este propósito ya que esto permite correlacionar los resultados y detectar cualquier anomalía o cambio en el sistema no esperado o no considerado con anterioridad.

Otros fitorreguladores utilizados en este trabajo fueron dos citocininas, adenina y 2ip, de las cuales la que mejor estimuló el cultivo fue la adenina.

En cuanto a las auxinas, actualmente se está probando con un nuevo fitorregulador sintético conocido como dicamba a una concentración de 2 mg/l. con base en lo recomendado por Close & Gallegher-Ludeman (1989). Con este fitorregulador se ha logrado mejorar la inducción de callo de maíz de algunas variedades, como por ejemplo en Tuxpeño. Sin embargo, no es recomendable para uso prolongado durante el mantenimiento del callo, ya que posteriormente promueve oxidación del tejido. Probablemente el uso de un antioxidante podría evitar este efecto secundario deletéreo (Wang, 1987).

Nutrientes y vitaminas

Los nutrientes y vitaminas fueron proporcionados por el medio elegido "R2". Este medio contiene los nutrientes y vitaminas en las proporciones adecuadas para cultivar células de maíz (ver cuadro 2), medio obtenido en nuestro laboratorio en trabajos anteriores (Sánchez de Jiménez, E. et al 1988). Sin embargo, se decidió probar el efecto de diversas concentraciones de fosfato (KH_2PO_4), ya que en la literatura se encuentran trabajos en los cuales se ha demostrado que en ese medio este nutriente puede favorecer el crecimiento celular y así incrementos en la concentración del fosfato. trae como consecuencia aceleración en el desarrollo del cultivo. Tal es el caso de la investigación

realizada por Horn, Martin & Widholm (1992), en la cual se detecta un aumento en el crecimiento del cultivo de células en suspensión de sorgo al incrementar la concentración de fosfato, proponiendo por último como concentración óptima de KH_2PO_4 1.2 mM.

Para las células de maíz, la concentración que se encontró adecuada (ver tablas 11 y 12) fué de 510 mg/l de la misma sal equivalente a 3.75 mM, lo que nos indica que este cultivo requiere de una concentración mayor de fosfato que las células de sorgo.

Nitrógeno orgánico e inorgánico.

El medio "R" que básicamente contiene las sales del medio MS (Murashige-Skoog, 1962), presenta una concentración de NH_4NO_3 y KNO_3 adecuada para la gran mayoría de las especies vegetales en cultivos in vitro, sin embargo de acuerdo con Salonen y Simola (1977), trabajando con células de *Atropa belladonna*, concluyeron que el uso combinado de fuentes de nitrógeno entre sales minerales y compuestos orgánicos mejora la actividad de la enzima nitrato reductasa por lo que la utilización de este recurso es más eficiente.

Estos mismos autores, en un reporte posterior (Salonen and Simola 1989), trabajando con células de *Atropa belladonna* encontraron que la concentración óptima de NH_4NO_3 es de 7.5 mM lo cual les da buenos resultados en sus cultivos; sin embargo, si a esta fuente de nitrógeno se le añade una fuente de nitrógeno de tipo orgánico, el cultivo respondió satisfactoriamente aumentando el crecimiento del cultivo. Ellos utilizaron como fuente orgánica de nitrógeno "la prolina", en una concentración de 2.5 mM.

El nitrógeno es un factor importante para el crecimiento del cultivo. Sin embargo se requiere conocer el tipo de células y los factores que se encuentran involucrados en el aprovechamiento de dicho elemento. Salonen and Simola (1989) reportaron en cultivos de caldo de *Atropa Belladonna* que el uso de glutamina y prolina en el medio como única fuente de nitrógeno daba un mejor rendimiento en el cultivo.

El medio "R" (Loyola and Sánchez de Jiménez, 1986) contiene 20 mM de KNO_3 y 20 mM de NH_4NO_3 . Al realizar comparaciones con otros trabajos observamos que los requerimientos siempre son diferentes en distintos cultivos. Horn, Martin y Widholm (1992), al optimizar un medio de cultivo de células de sorgo, encontraron que el uso de KNO_3 en una concentración de 40 mM era la más adecuada; si se añade 60 mM en el medio, el crecimiento del cultivo se reduce. Esto indica que no necesariamente el incremento en fuente nitrogenada va a mejorar el uso de este recurso por los cultivos.

De las dos fuentes de nitrógeno de tipo orgánico utilizadas, prolina en una concentración de 20 mM y asparagina 14 mM, (ver tabla 18) ambas dieron resultados positivos, ya que el crecimiento del cultivo se estimuló. El incremento celular no fue alto, pero sí se observaron diferencias significativas con respecto al control. Esto indica que el aumento de esta fuente de nitrógeno orgánico sobre la concentración basal de nitrógeno inorgánico que contiene el medio de cultivo, permite un mejor aprovechamiento de este elemento tan importante para apoyar la síntesis de aminoácidos y de bases nitrogenadas en el cultivo.

La base de esta mejor utilización se debe a la regulación de las enzimas que lo utilizan. Así, se ha demostrado que el cambio en la fuente nitrogenada que se le proporciona al cultivo genera diferentes cambios de asimilación de las enzimas de este metabolismo del nitrógeno (Loyola-Vargas and Sánchez de Jiménez, 1986). Ellos observaron que el uso de amonio como única fuente de nitrógeno produce la muerte de los subcultivos; además de que, en presencia de nitrato, hay un incremento en la actividad de GS (glutamina sintetasa), lo que sugiere que GS es el responsable primario para la asimilación del nitrógeno. También mencionan que, bajo condiciones en suspensión,

glutamina, alanina, glutamato y prolina se acumulan durante el ciclo de crecimiento como un resultado de la actividad y asimilación de las enzimas por el nitrógeno.

Otros factores moduladores del crecimiento.

Uno de los factores involucrados y que desconocemos totalmente, es el medio condicionado. Según (Manoharan and Gnanam 1992, se sabe que si en un cultivo en suspensión se utiliza medio condicionado se induce la división celular y por lo tanto el crecimiento del cultivo.) Sin embargo, el factor o factores que estén promoviendo el incremento de la población es aún desconocido y por ello no siempre se puede promover el mismo efecto en el crecimiento celular del cultivo. Sin embargo, nosotros incluimos el medio condicionado en nuestros cultivos (ver procedimiento "Establecimiento del cultivo primario en medio líquido) esperando obtener mejores resultados.

Además del medio condicionado, en el cual se desconoce la composición de nuevos elementos proporcionados por las mismas células, tenemos también a los extractos de tejidos en estado activo de crecimiento. La composición de estos extractos no es fácil definirla, sin embargo, se conocen varios ejemplos en los cuales con el uso de este tipo de extractos se han logrado buenos resultados, por ejemplo: agua de coco, jugo de jitomate extracto de levadura, de uva, de ciruela, leche de vaca y otros., que han sido aplicados a los cultivos en suspensión, obteniendo altos índices de crecimiento. (La Rue, 1947). Cabe señalar que, si se conociera el componente que promueve o participa de alguna manera en la división celular se tendría un mayor control y manejo del cultivo. Por ello se considera importante hacer una aproximación al estudio de los componentes tanto del medio condicionado como también de los extractos de tejidos utilizados. Así, al fraccionarlos por diversos criterios se puede reducir el número de componentes no indispensables y que en ocasiones pueden hasta ser perjudiciales al cultivo, dando a la vez condiciones mas adecuadas para un desarrollo más sano.

De los extractos utilizados en este trabajo los de embrión y el de eje de embrión a pesar de probarse en diferentes concentraciones no se obtuvieron buenos resultados.

De las concentraciones de extracto de callo probadas se encontró que a 0.1 ml/l del extracto promovía crecimiento del cultivo (ver tablas 5 y 6).

El extracto de nódulo en el medio de cultivo dió muy buenos resultados, obteniendo los mejores resultados de este trabajo (ver tabla 26).

Tejidos vegetales como factores de crecimiento.

Además de extractos naturales para promover el crecimiento de un cultivo en suspensión, también se ha logrado obtener el crecimiento del cultivo utilizando fragmentos de tejidos vegetales tales como hojas, tallos, ápices etc. Esto funciona al parecer con tejidos en crecimiento o que contengan zonas meristemáticas. DeGreet y Jacobs (1979) trabajando con cultivos de callo de *Beta vulgaris L.* reportaron el haber encontrado hormonas autónomas en los cultivos al añadirles fragmentos de hoja. Posteriormente Saunders y Danb (1984) repitieron el trabajo anterior, sólo que ellos utilizaron fragmentos de tallos para inducir crecimiento en los cultivos de callo de *Beta vulgaris L.* Este método para inducir el crecimiento del cultivo suele ser muy accesible y fácil. Sin embargo, con ello nos enfrentamos al mismo problema que cuando utilizamos extractos naturales: desconocemos cual es el factor que promueve el crecimiento del cultivo. Masuda, Nakagawa, y Sugawara (1988) fueron los primeros en utilizar segmentos de hoja de *Beta vulgaris L.* en cultivos de células en suspensión para promover la formación de una hormona autónoma y a la vez inducir el crecimiento del cultivo.

En este trabajo se usaron con éxito nódulos de plántulas de maíz que, al ser agregados al cultivo en suspensión, favorecieron su crecimiento (ver tabla 23) sin embargo, se podría pensar que el aumento celular observado en el cultivo podría ser

debido a células desprendidas de los mismos nódulos en división activa y no necesariamente a estímulos del crecimiento de las células del cultivo en suspensión. Por ello al introducir tejidos vivos en un cultivo de células en suspensión debe hacerse muy conciente de esta posibilidad y tener los controles necesarios. En nuestro caso este control consistió en hacer los extractos de los nódulos y probarlos en el sistema, confirmando que el incremento se debía al crecimiento del cultivo y no a la introducción de células vivas ajenas al cultivo (ver tabla 24).

Debido a la respuesta obtenida en los cultivos por el uso de extractos, pensamos que los extractos podrían tener un factor de tipo proteico, similar al reportado por Farmer y Ryan (1990). Ellos anunciaron el haber encontrado una hormona pequeña de tipo peptídica compuesta de 18 aminoácidos, la cual han bautizado con el nombre de "super PHIF". Esta son las primeras evidencias reportadas de una hormona peptídica en plantas y sugieren que, péptidos análogos podrían controlar diferentes procesos metabólicos en la planta. Estos autores son los primeros hasta ahora que han reportado un péptido capaz de controlar diversas funciones de la planta, ellos comparan su función con el sistema de prostaglandinas en animales encontrando gran similitud en la forma de activar estos compuestos. (Farmer and Ryan, 1990).

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Conclusiones:

De acuerdo a lo anterior, en este trabajo se establecieron cultivos en suspensión encontrando condiciones de manejo adecuadas que permiten finalmente obtener cultivos sanos. Podemos mencionar como ejemplo la esterilización por filtración de los medios de cultivo. La inoculación de los cultivos en suspensión y la mejor técnica que se determinó para llevar a cabo la evaluación de los cultivos en suspensión.

Los factores de crecimiento que se optimizaron fueron: adenina 0.1 mg/l; KH_2PO_4 510 mg/l; prolina 20 mM; Asparagina 14 mM y tejidos vegetales. Siendo en este caso 15 nódulos de maíz de 5 días de germinado. por cultivo. Encontrando a las concentraciones antes mencionadas como más adecuadas para promover división celular y por lo tanto crecimiento del cultivo.

Finalmente el medio de cultivo quedó con la siguiente composición:

Medio RD 1/2 el cual contiene como fitoreguladores 2-4 Diclorofenoxiacético 1 mg/l y cinctina 0.05 mg/l se le adicionó adenina 0.1 mg/l, prolina 20 mM, asparagina 14.0 mM y extractos de nódulos.

Además de los factores de crecimientos antes mencionados se logró identificar al inositol como un nutriente básico dentro del medio de cultivo ya que los cultivos en suspensión en ausencia de éste nutriente tomaban un color café, y el cultivo tendía a morir rápidamente.

Reconociendo la importancia de la oxigenación y homogeneidad para este tipo de cultivos, se probaron distintas velocidades de agitación encontrando que a 100 rpm es la velocidad mas adecuada ya que el cultivo se encuentra homogéneo, al igual que los nutrientes se encuentran dispersos en todo el cultivo y el movimiento permite una oxigenación adecuada.

Observamos que dependiendo el tipo celular que contienen los cultivos, podemos utilizar diferentes recursos para evaluar el cultivo. En el primer experimento el uso de paquete celular fué suficiente para medir el crecimiento celular, pero en el 2o experimento las condiciones cambiaron encontrando el conteo celular como la técnica mas adecuada para evaluar el cultivo.

Además, con el uso de medio condicionado, tejidos vivos y de distintos extractos de éstos, logramos observar que existe un factor no identificado aún que interviene de manera importante en el establecimiento y crecimiento del cultivo en suspensión de células de maíz. Hasta ahora, pensamos en la posibilidad de que se trate de una hormona de tipo peptídica, similar a la reportada por Farmer y Ryan (1990).

Bibliografía

Anderson, J. M. (1989). In second Messengers in plant growth and development, ed. Boss W.F. & more, D. J. (Liss, New York), pp 181-212.

Armstrong, C. L. and Green, C. E. (1985). Establishment and maintenance of friable embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta* 164, 207-214.

Ashmore, S. E. & Gould, A. R., (1981). Karyotype evolution in a tumor derived plant Tissue culture analyzed by giemsa banding. *Protoplasma*, 106(3-4): 297-308.

Close, K. R. & Gallagher-Ludeman, L. A. (1989). Structure- activity relationships of auxin-like plant growth regulators and genetic influences of the culture induction response in maize (*Zea mays* L.). *Plant Science*, 61: 245-252.

Dahlgren, R. M. T.; Clifford, H. T. and Yeo, P. F. (1985). The families of the monocotyledons sprunger-verlog. New York pp 520.

DeGreet, W. & Jacobs, M. (1979). In vitro culture of the sugar beet: Description of a cell line with high regeneration capacity. *Plant Sci. Lett.* 17: 55-61.

Doods, T. H. & Roberts, L. W. (1982). Experiments in plant tissue culture. Cambridge Univ. Press, Nueva York, N. Y. págs 107-127.

Dougall, D. K., (1980). "Nutrition and metabolism", en: *Plant tissue culture as a source of biochemicals*, E. T. Straba (ed.), C. R. C. Press Inc., Págs 21-58.

Escobar Romulo (1966). *Enciclopedia Agricola y Conocimientos Afines Tomo II. México D. F. Pag. 630-645.*

Farmer, E. E. & Ryan, C. A. (1990). Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induced synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 7713-7716

Gamborg, O. L., Constabel, F. y Miller, R. A., (1970). Embryogenesis and production of albino plants from cell cultures *Bromus inermis*. Planta. 95: 355-358.

Grambow, H. J., Kao, K. M., Meller, R. A. & Gamborg, O. L. (1972). Cell division and plant development from protoplast of carrot cell suspension cultures. Planta, 103: 348-355.

Green, C. E. and R. L. Phillips (1975). Plant regeneration from tissue cultures of maize. Crop. Sci. 15: 417-421.

Horn, M. E., Martin, B. A., Widholm, J. M. (1992). Photoautotrophic Growth of Soybean cells in Suspension culture. II. Optimization of culture medium and conditions. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 30: 85-91.

Kameya, T. Hinata, T., (1970). Induction of haploid plants from pollen grains of *Brassica*. Jap. J. Breed. 20: 82-87.

King, P.J.,(1980). "Plant tissue culture and the cell", en: Advances in biochemical engineering, vol. 18., A. Fuchter (ed.). Ed. Board GDR., págs. 1-38.

Koyama, H., Ojima, K. & Yamaya, T. (1992). Characteristics of aluminum-adapted carrot cell: Uptake and utilization of the phosphate. Plant Cell Physiol. 33(2): 171-176.

Langezaal, C. R. and Scheffer, J. J. C. (1992). Initiation and growth characterization of some hop cell suspension cultures. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 30: 159-164.

La Rue, C. (1947). Growth and regeneration of the endosperm of maize in culture. *Amer. J. Bot.* 34:585.

Lavergne, D., Nato, A., Dupois, J.-M., Péan, M. and Chagvardieff, P. (1992). Evidence for the expression of morphological and biochemical characteristics of C₃-photosynthesis in chlorophyllous callus cultures of *Zea mays*. *Physiol. Plant.* 84: 292-300.

Loyola-Vargas V. M. & Sánchez de Jiménez, E. (1986). Effect of nitrate, ammonium and glutamine on nitrogen Assimilation Enzymes during Callus growth of maize. *J. Plant Physiol.* 125: 235-242.

Manoharan, K. & Gnanam, A. (1992). Growth Stimulation by Conditioned Medium and Spermidine in Low-Density Suspension Cultures of Rice. *Plant Cell Physiol.* 33(8): 1243-1246.

Masuda, H. Nakagawa, R. & Sugawara, S. (1988). Hormone- Autonomous Suspension culture from Leaf Explants Of Sugar Beets in Liquid Medium. *Plant Cell Physiol.* 29(1): 75-78.

Meier, Helmut M. E. (1978). *Plantas Cultivos, Cosechas Vol I* Ed Aedos Barcelona Enciclopedia sistematica Agropecuaria. Pag. 284-293.

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

Nadel, L. B., altman, S. and Ziv, M. (1989). Regulation of somatic embriogenesis in cercly cell suspension. *Plant cell. Tissue and Organ Culture.* 18: 181-189.

Nagata, T. & Takebe, I.,(1970). Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts. *Planta,* 92: 301-308.

Protacio, C. M., Dai, Y., Lewis, D.F. & Flores, H. E. (1992). Growth Stimulation by Catecholamines in Plant Tissue/ Organ Cultures. *Plant Physiol.* 98: 89-96.

Salonen, M. L. & Simola, L. K. (1989). Effect of Nitrate, Ammonium and Amino acids on Growth and Nitrate Reductase Activity in Suspension Cultures of *Atropa Belladonna*. *Plant Cell Physiol.* 30(8): 1177-1181.

Sánchez, J. E. , Albores, M. & Loyola, V. V. M. (1981). Effect of 2,4-D analoges on the induction and maintenance of callus in maize tissue culture. *Ann Appl Biol.* 98: 347-353

Sánchez de Jiménez, E., Vargas, M., Aguilar, R. y Jiménez, E. (1988). Age-dependent responsiveness to cell differentiation stimulus in maize callus culture. *Plant Physiol. Biochem.* 26: 723-732.

Saunders, J. W. and Danb, M. E. (1984). Shoot regeneration from hormone-autonomous callus from Shoot cultures of several sugar beet (*Beta vulgaris* L.) genotypes. *Plant Sci. Lett.* 34: 219-223.

Sawyer, H.& Hsiao, K-C. (1992). Effects of Autoclave Induced Carbohydrate Hydrolysis on the Growth of *Beta vulgaris* cell in suspension. *Plant cell, Tissue and Organ Culture.* 31: 81-86.

Sierra, M. I., Heijden, R. V.D., Lccr, T.V.D. & Verpoorte, R. (1992). Stability of alkaloid proJuction in cell suspension cultures of *Tabernaemontana divaricata* during long-term subculture. *Plant cell, Tissue and Organ Culture* 28: 59-68.

Smith, Jane A. (1984). Feeder layer support of low density populations of *Zea mays* L. suspension cells. *Plant Science Letters.* 30: 67-72.

Street, H.E. (1973). Plant cell cultures: Their potential for metabolic studies in biosynthesis its control in plants. Academic Press, Milborrow (Ed). Pag: 93-125.

Street, H.E. (1977). Cell (suspension) cultures-techniques en plant tissue and cell culture, H. E. Street ed. Oxford, Blackwell scientific publications, págs. 61-102,

Thomas, E. & Darey, M.R., (1975). From single cells to plants, Wykebam Publ., Londres.

Uchimiya, H. and Murashige, T. (1974). Evaluation of parameters in the isolated of viable protoplasts from cultured tobacco cell. Plant Physiol. Lancaster, 54.

Wang, A. S., R. L. Phillips and C. C. Mi. (1987). Cell cicle parameter and accumulation of metaphase cells in maize (*Zea mays* cultivar Black mexican sweet) suspension cultures. Plant Sci (Shannon) 46(1): 53-62.

Wang A. S. (1987). Callus induction and plant regeneration from maize mature embryos. Plan Cell Reports. 6: 360-362.

Watson, B. S., Fletcher, J. S. & Russell, S. D. (1992). Quantification of organelle changes in plant suspension cultures during growth. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 31: 37-46.

Weatherhead, M. A. Burdon, J. & Henshaw, G.G. (1978). Some effects of activated charcoal as an additive to plant tissue culture media. Z. Pflazenphysiol. 89: 141-147.

White, P. R., (1934). Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. Plant Physiol. Lancaster 9 : 585-600.