

225



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BIOLOGIA

OPTIMIZACION Y CARACTERIZACION FISIOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE CULTIVOS EN SUSPENSIÓN DE CELULAS DE MAÍZ (ZEA MAYS, L. RAZA CHALQUEÑO).

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A :
LETICIA GEORGINA VILLAVISCENCIO JUAREZ

DIRECTOR DE TESIS: ING. MARIA TERESA DE JESUS OLIVERA FLORES

CO-DIRECTOR DE TESIS: DR. JORGE MANUEL VAZQUEZ RAMOS.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

2002

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

**"Optimización y Caracterización Fisiológica y Bioquímica de Cultivos en
Suspensión de Células de maíz (*Zea mays*, L. raza Chalqueño)"**

realizado por

Leticia Georgina Villaviscencio Juárez

con número de cuenta 8347015-2, quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Ing. María Teresa de Jesús Olivera Flores. *María Teresa Olivera Flores*

Propietario

Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos. *Jorge Manuel Vázquez Ramos*

Propietario

Dr. Oscar Alberto Flores Villela. *Oscar Alberto Flores Villela*

Suplente

M. en C. Josefina Herrera Santoyo. *Josefina Herrera Santoyo*

Suplente

Dra. Patricia Guevara Fefer. *Patricia Guevara Fefer*

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.

Consejo Departamental de Biología

Patricia Ramos Morales
Dra. Patricia Ramos Morales



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

AGRADECIMIENTOS:

A MIS ASESORES ING. MARIA TERESA DE JESÚS OLIVERA FLORES Y AL DR. JORGE M. VÁZQUEZ RAMOS POR LA DIRECCIÓN DE ESTA TESIS, ASÍ COMO A LOS DEMÁS SINODALES QUE AMABLEMENTE ME APOYARON Y ACEPTARON SER REVISORES DEL PRESENTE TRABAJO

AL M. EN C. ELPIDIO GARCÍA RAMÍREZ Y A M. EN C. RICARDO LEÓN POR SU VALIOSA ASESORÍA.

DEDICATORIA:

A MI MAMÁ POR SU APOYO

A MI ABUELITA VENTURITA

A MIS HERMANOS SERGIO Y LAURA

A MIS SOBRINOS LUIS ALBERTO, MELISSA Y CARLOS

A MIGUEL ÁNGEL

A LA MEMORIA DE MI PADRE.

Abreviaturas

(metil- ³ H)-T	Desoxitimidina [Metil- ³ H]
(metil- ³ H)-TTP	Desoxitimidina trifosfato (metil- ³ H)
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
Arg o R	L – Arginina
Asn o N	L – Asparagina
Asp o D	L – Aspártico
BAP	6-Bencil aminopurina
BSA	Albúmina de suero bovino
Cl	Curie
CPM	Cuentas por minutos
DATP	Desoxiadenosina trifosfato
DCTP	Desoxicitosina trifosfato
DGTP	Desoxiguanosina trifosfato
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
Dna pol	DNA polimerasa
DNTP	Desoxinucleótido trifosfato
EC	Embrión completo
EDTA	Ácido etilen diamino tetra-acético
EE	Eje Embrionario
Gln o Q	Glutamina
Gly o G	Glicina
H.C.	Hidrolizado de Caseína
L- Pro	L – Prolina,
ND	Número de Duplicaciones
pH	Potencial de hidrógeno
POPOP	2,2-p-fenilen-bis(5-feniloxazol)
PPO	2,5-difenil oxazol
r.p.m.	Revoluciones por minuto.
TCA	Ácido tricloroacético
TD	Tiempo de Duplicación.
TRC	Tasa Relativa de Crecimiento
STH	Segmento de Tallo y Hoja.

ÍNDICE

Resumen	1
I Introducción	4
II Revisión de Literatura	6
Ubicación Taxonómica del maíz	7
Características de la Semilla de maíz	7
Características de la planta de maíz	9
Origen de la raza Chalqueño	11
Cultivo de Tejidos Vegetales	12
Medios de Cultivo	13
Compuestos Inorgánicos	13
Macronutrientes	13
Micronutrientes	15
Compuestos Orgánicos	16
Vitaminas y Suplementos Indefinidos	16
Aminoácidos	16
Reguladores de crecimiento	17
Auxinas	17
Citocininas	19
Tipos de Cultivo de Tejidos Vegetales	20
Cultivo de Callo	20
Cultivo de Células en Suspensión	22
Ciclo Celular	25
Antecedentes de Cultivos de Callo en Gramíneas	30
Antecedentes de Cultivos en Suspensión de Gramíneas	31
III Objetivos e Hipótesis	33
IV Materiales y Métodos	36
Aspectos Generales	37
Material Biológico	37
Preparación de Medios de Cultivo	39
Incubación de cultivos <i>in vitro</i>	40
Etapa I Establecimiento del Cultivo	40
Métodos de Esterilización	40
Tipos de Explante	41
Etapa II Inducción, proliferación y Mantenimiento de Callo	44
Medios de Cultivo Utilizados en Inducción y Proliferación	45
Inducción	46
Proliferación y Mantenimiento	47
Etapa III Establecimiento y Evaluación de Cultivos de Células en Suspensión	47
Iniciación y Mantenimiento	47
Establecimiento de Cultivos en Suspensión	47
Condiciones de Cultivo	48
Medios de Cultivo Utilizados en Suspensiones	48
V Resultados y Discusión	55
VI Conclusión	85
VII Anexos	87
Bibliografía	98

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue la optimización y caracterización de células en suspensión de maíz a través de parámetros físicos y bioquímicos. Con la finalidad de obtener mayor cantidad de material biológico, materia prima, necesaria en el área de investigación. Para lo cual se estableció, seleccionó y caracterizó mediante diversos parámetros, cultivos callogénicos y en suspensión originados de diferentes explantes en medios de cultivo.

En la inducción de callo se utilizaron dos explantes, el Eje Embrionario (EE) y Segmentos de Tallo y Hoja (STH) observándose que el mejor es éste último. Además, se determinó que la presencia de L-prolina es fundamental para la inducción de callo de STH. Así mismo, se determinó que el medio que contiene una relación de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ de 1:4 (C5-0) es mejor para la inducción de callo de STH que los medios que presentaban una relación 1:2. (C3, C4).

En la etapa Proliferación de callo se probó sólo un explante (STH) ya que este fue mejor que Eje Embrionario; y se probaron los medios con relación de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ de 1:2 y 1:4 observándose que la relación 1:4 en esta etapa también estimuló la proliferación de los callos.

Para la etapa de suspensiones se hizo un ensayo comparativo entre los explantes Eje Embrionario, Embrión Completo y Segmento de Tallo y Hojas, con la finalidad de conocer si existe respuesta diferencial en el crecimiento de células en fase suspensión y se probó las relaciones nitrato 1:2 y 1:4 observándose que la relación 1:2 es mejor para los explantes Eje Embrionario y Embrión Completo y la relación 1:4 continua siendo mejor para Segmentos de Tallo y Hoja, sin embargo, el crecimiento de éste último es mayor que en cualquiera de estos dos explantes.

Se evaluó el crecimiento de suspensiones en cinco concentraciones de BAP, siendo mejor el S5 con $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ y en general el comportamiento de las concentraciones es dosis respuesta. Así mismo se probó la concentración de 2,4-D y se observó que la concentración $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ en medio S5 es la ideal.

Posteriormente se probó indirectamente que el cultivo estuviera en fase S mediante curvas de incorporación de timidina y de su posterior inhibición. Como conclusión, nuestro cultivo en suspensión consiste de una población heterogénea de células que se encuentran en diferentes etapas del ciclo celular, tenemos una muy pequeña población de células que se encuentran en división, y otra que se encuentra en la fase de síntesis, sin embargo, una gran parte de nuestra población se encuentra en fase G₀.

El inhibidor está a muy baja concentración por lo cual la inhibición de la incorporación no es total y desde el principio en el tratamiento T3, sin embargo, existe un leve abatimiento a las 36 horas.

Aunque muchos autores utilizan como único parámetro para caracterización de suspensiones el peso fresco, es de gran importancia tomar a la par otros parámetros, tales como el peso seco, y la cuantificación de proteínas, o la incorporación de timidina ya que esto nos denota como se encuentra nuestro cultivo.

I INTRODUCCIÓN

El cultivo de tejidos vegetales es una herramienta que permite obtener una gran cantidad de material biológico para el estudio de la división celular en plantas superiores. Esta técnica permite controlar las condiciones físicas y químicas del sistema, logrando así contar con material biológico en cualquier momento.

El cultivo de tejidos vegetales toma relevancia en especies de gran importancia económica como el maíz ya que este cereal es el tercero en importancia del mundo, por lo que ha sido ampliamente utilizado en investigaciones a nivel fisiológico y bioquímico, dando como resultado una gran cantidad de información sobre la respuesta a reguladores del crecimiento, transporte de nutrientes, genes, entre otros (Freeing y Walbot, 1994).

Sin embargo, aún cuando las mazorcas de maíz presentan una gran cantidad de semillas por mazorca, para la realización de estudios se requiere una fuente de material constantemente como fuente de enzimas y sustratos, por lo cual es necesario contar con una alternativa la cual es proporcionada por el cultivo de células en suspensión; este sistema se origina de tejido indiferenciado (callo) producido por alguna sección de la planta, colocándolos en medios de cultivo que les proporcionan las condiciones necesarias para la proliferación celular.

En estudios bioquímicos y moleculares es prerequisite contar con sistemas celulares homogéneos, para lo cual es necesario evaluar su crecimiento a través de parámetros fisiológicos como peso fresco, peso seco y número de células, o monitoreando metabólicamente los cultivos por cuantificación de otros parámetros bioquímicos tales como contenido de proteína total, contenido de DNA y RNA, demanda de oxígeno, actividad total de algunas enzimas como peroxidasas, etc. (Street, 1977). En este trabajo se optimizó y caracterizó cultivos de células en suspensión de maíz de la raza Chalqueño, tomando en cuenta los parámetros fisiológicos: peso fresco y peso seco y bioquímicos: contenido de proteínas e incorporación de Timidina tritiada.

II REVISIÓN DE LITERATURA.

UBICACIÓN TAXONÓMICA DEL MAÍZ

El maíz es una planta herbácea anual, la cual ha sido clasificada taxonómicamente de la siguiente manera:

Reino	Plantae
División	Anthophyta (Angiospermas)
Clase	Monocotyledones
Orden	Commelinales
Familia	Poaceae
Género	Zea
Especie	<i>Zea mays</i>

(International Code of Botanical Nomenclature, XV International Botanical Congress, 1993).

CARACTERÍSTICAS DE LA SEMILLA DE MAÍZ.

El fruto del maíz es indehiscente y se denomina cariósipide (pericarpio y testa adheridas). Este fruto se desarrolla a partir de un óvulo que ha sido fecundado, está formado de embrión, endospermo, capas protectoras y aleurona (Essau, 1976).

El embrión o esporofito joven, es el resultado de la fertilización de una célula huevo dentro del saco embrionario por uno de los núcleos del grano de polen (Essau, 1976), presenta un eje provisto de un cotiledón único o escutelo lateral escutiforme (Essau, 1976) que en su superficie abaxial exhibe una epidermis epitelial secretora que está en contacto con el endospermo, tejido que se forma de la triple fusión de dos núcleos polares con un gameto masculino. El

endospermo, tejido de reserva de la semilla, presenta un alto contenido de almidón (amilosa y amilopectina) el cual es movilizado por la capa de células denominada aleurona para la alimentación del embrión durante la germinación (Bewley y Black, 1994; Essau, 1976).

El eje embrionario presenta en su zona apical una plúmula que lleva las primeras hojas verdaderas (primordios foliares) y está cubierta por el coleóptilo, y en el polo opuesto del eje se encuentra la raíz embrionaria o radícula, cubierta por la coleorriza (Figura 1) (Bewley y Black, 1994).

La capa terminal es la sección que une al olote con una estructura esponjosa adaptada para la rápida absorción de humedad. Entre esta capa y la base del embrión se encuentra un tejido negro conocido como la capa hilar, la cual funciona como un mecanismo sellante durante la maduración. La formación de la capa negra indica que el grano llegó a la madurez (Essau, 1976).

El pericarpio, que es la cubierta del fruto (de origen materno), se conoce como testa o cubierta de la semilla y deriva de tegumento(s) y presenta una función de protección (Bewley y Black, 1994) Figura 1.

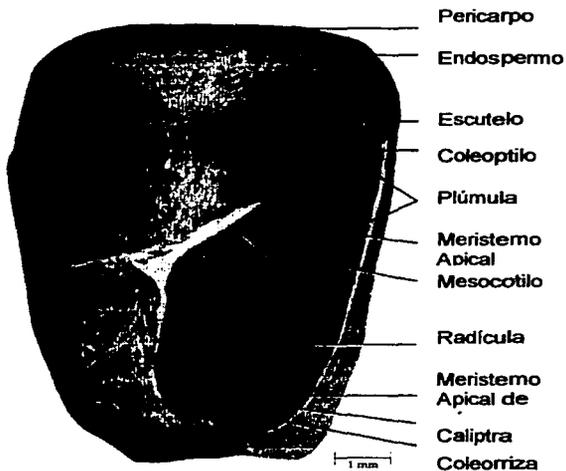


Figura 1.- Corte longitudinal de una semilla de maíz (Tomado de Raven, et al 1999).

CARACTERÍSTICAS DE LA PLANTA DE MAÍZ.

Los tallos de gramíneas están constituidos de tres sistemas de tejido, el epidérmico, el fundamental y el vascular. En el caso de las plantas inmaduras, los haces vasculares se encuentran dispersos en el parénquima fundamental y no presentan cortex ni médula definida. El parénquima subepidérmico está fuertemente esclerificado (Esau, 1976).

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

El eje de la planta está formado de fitómeros u hojas; estos fitómeros son alternos, opuestos y con vainas basales envolventes, de las cuales los primeros 5 a 7 forman la fase juvenil de la planta (Figura 2), los más distales la adulta. La fase vegetativa del tallo crece 3 a 4 semanas bajo condiciones normales. Durante esta fase los entrenudos se alargan lentamente y la parte superior del tallo consiste de hojas. Con la iniciación de la inflorescencia, todos los entrenudos basales (cinco o seis) permanecen con bajo crecimiento y ellos dan lugar al sistema radicular (Freeling y Walbot, 1994).

El crecimiento de la planta está dado por la presencia de tres tipos de meristemas, el apical, el del cuerpo del tallo y el radicular. El meristemo apical produce tejido axial hacia abajo y primordios foliares laterales. El del tallo o del engrosamiento primario periférico, está en división continua; es un derivado del apical y forma parénquima fundamental así como cordones procambiales que se transforman en haces vasculares posteriormente. Los entrenudos se alargan después que el eje alcanza cierta anchura. Posterior al alargamiento, se presenta un incremento en espesor por aumento de tamaño y división de las células del parénquima fundamental (Essau, 1978).

El meristemo radicular se encuentra protegido por una capa de células (la caliptra) que cubre otra capa de cuatro células, llamada columna inicial, que a su vez cubre a dos células centrales.

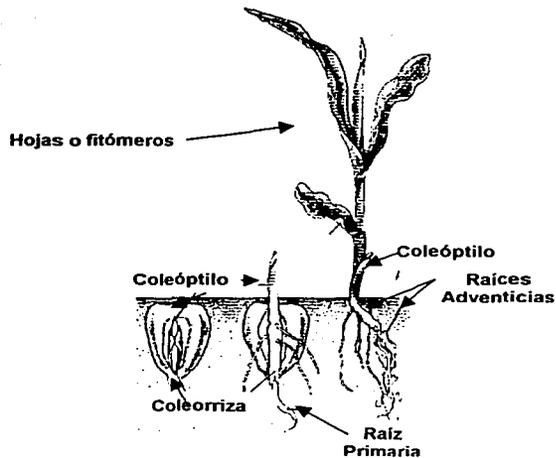


Figura 2.- Estructura de una plántula de maíz (Tomado de Raven, et al 1999)..

ORIGEN DE LA RAZA CHALQUEÑO.

El ancestro del maíz actual que crece en México y áreas vecinas a Mesoamérica (Wilkes, 1967) se cree está cercanamente emparentado con el Teosinte (*Zea spp*), maíz silvestre (Doebley e Itis, 1980; Galinat, 1992). A pesar de que el origen del maíz cultivado en tierras altas del centro de México es desconocido, la raza palomero toluqueño ha sido considerada como una raza con ancestros indígenas (Wellhausen *et al* 1952). Sin embargo, y de acuerdo con evidencias de domesticación, el origen del maíz tuvo lugar hace 7000 años en el centro y sureste de México (MacNeisk, 1985 y Goodman, 1988). Se ha propuesto un "multicentro de domesticación del maíz", con dos de los cuatro centros en el centro de México (Kato, 1984)

La raza Chalqueño ha sido clasificada dentro de un grupo de razas de origen ancestral que presenta morfología vegetal (Anderson y Cutler, 1942) y frecuencia isoenzimática similares entre ellas; este grupo está formado, además del Chalqueño, por las razas palomero toluqueño, cónico, arrocillo amarillo y cacahuacincle (Doebley, 1985).

La raza Chalqueño está caracterizada por ser altamente pubescente, y frecuentemente con tallos púrpuras, hojas correosas, colgantes, raíces frágiles e inflorescencias masculinas poco ramificadas así como espigas de forma cónica y crece en áreas con una estación de crecimiento largo y en altitudes arriba de los 2000 metros en el centro de México; está adaptado a zonas frías (12.5 a 7 ° C) (Anderson y Cutler, 1942).

CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.

El cultivo de tejido Vegetal descansa sobre dos hechos biológicos, el primero, la totipotencialidad y autonomía, basadas en los dogmas expresados por Matthias Schleiden en 1838 y Theodor Schwann en 1839 respecto al hecho que las células son componentes de plantas y animales; y el dogma planteada por Rudolf Virchow de su totipotencialidad. Dichas teorías son demostradas en dos pasos, el primero es la multiplicación de una sola célula, y el segundo su transformación en un organismo completo (Vasil, 1985).

El segundo hecho es que las fuentes de nutrición para el crecimiento vegetal en la naturaleza son los nutrientes minerales, los cuales son obtenidos del suelo, junto con el agua, a través del sistema radicular; el dióxido de carbono atmosférico, el cual es utilizado en el proceso de fotosíntesis para proveer carbono como una fuente de energía básica. Finalmente, el cuerpo vegetal, particularmente sus regiones meristemáticas y órganos jóvenes tales como hojas; usando el carbón fijado y minerales, sintetizan todas las vitaminas y varias sustancias de

crecimiento vegetal que son críticas y esenciales para el crecimiento y desarrollo normal de la planta. Por lo cual se dice que las plantas son autotróficas (Salisbury y Ross, 1992).

Por tanto, el objetivo principal de estas técnicas del cultivo de tejido vegetal *in vitro* es proveer artificialmente las sustancias nutricionales a través de los medios de cultivo a los explantes tales como órganos, tejidos, callos o células. Así mismo, estos explantes se cultivan bajo condiciones ambientales controladas (temperatura, humedad relativa, fotoperiodo, etc.), las cuales son semejantes a las condiciones ambientales bajo las cuales crecen las plantas intactas en la naturaleza (Vasil, 1985).

En general, los componentes del medio de cultivo para células vegetales se dividen en dos: compuestos inorgánicos y compuestos orgánicos. Los primeros están constituidos de macronutrientes y micronutrientes, y dentro de los segundos se encuentran las vitaminas y suplementos indefinidos, los aminoácidos, los carbohidratos y finalmente los fitoreguladores, sustancias de crecimiento vegetal (Hurtado y Merino, 1988).

MEDIOS DE CULTIVO

COMPUESTOS INORGÁNICOS

MACRONUTRIENTES

Las sales macronutrientes son el Nitrógeno, Fósforo, Potasio, Calcio, Magnesio y Azufre. A continuación se dará una breve reseña de las principales.

El nitrógeno puede ser suplementado en el medio como nitrógeno orgánico (NH_4^+ , aminoácidos, sustancias no definidas) o inorgánico como NO_3^- . Es el principal responsable del crecimiento y diferenciación de tejido siendo adicionado en la forma de NH_4^+ junto con NO_3^- . Las células vegetales requieren un pH ácido para absorber el ión nitrato, dicha absorción hace que el medio de cultivo se torne más básico lo cual permite la absorción del ión amonio. La absorción de este último ión produce la excreción de H^+ al medio haciéndolo nuevamente más ácido, por lo cual es importante la adición del ión amonio junto con el nitrato (George y Sherrington, 1984).

Pequeñas cantidades del ión amonio son esenciales para el buen crecimiento del cultivo (Gamborg *et al.*, 1968 a; Bayley *et al.*, 1972). Sin embargo, se ha demostrado que en suspensiones de soya y de trigo, las células crecen igualmente bien en presencia o ausencia de este ión (Bayley *et al.*, 1972 a). Por otro lado, se demostró que este ión produce baja frecuencia de división celular de protoplastos de papa (Shepard y Totten, 1977), de *Salpiglossis* (Boyes *et al.*, 1980), y tres especies de *Asteraceae* (Okamura *et al.*, 1984).

Los niveles de fósforo varían según el sistema utilizado, para el crecimiento de tejido de médula de tabaco, valores mayores de 2 mM son inhibitorios (Murashige y Skoog, 1962). Para *Haplopappus gracilis*, una concentración de 1.25 es subóptima; sin embargo, cuando se duplica tal concentración, la tasa de crecimiento aumenta en un 50 % (Eriksson, 1965).

El azufre es administrado en el medio de cultivo en forma de sales (SO_4^{2-}) o como los aminoácidos, L-cisteína, L-metionina y Glutamina. Estos aminoácidos son absorbidos satisfactoriamente por tejido de tabaco (Hart y Filner, 1969).

El potasio a concentraciones de 1 mM ayuda en el crecimiento del cultivo; concentraciones mayores de 20 mM producen embriogénesis en suspensiones de zanahoria (Brown *et al.*, 1976).

MICRONUTRIENTES

Los micronutrientes o microelementos requeridos en los medios de cultivo de tejido vegetal son Hierro, Manganeseo, Boro, Zinc, Molibdeno, Cobre, Yodo y Cobalto ya que son componentes de proteínas de células vegetales de importancia metabólica y fisiológica.

La deficiencia de Hierro reduce el crecimiento de suspensiones de arroz más sensiblemente que cualquier otro ión. La carencia de Zn^{++} , Cu^{++} , B^{++} , Mn^{++} y Mo también tiene un efecto inhibitorio que es más pronunciado con Zn^{++} y poco detectable con Mo (Ohira *et al.*, 1975). Sin embargo, Murashige y Skoog (1962) no observaron ninguna diferencia en crecimiento de tejido de tabaco en concentraciones variantes de Mo. A pH alto el Hierro se precipita lo cual reduce su disponibilidad, por ello es adicionado en forma quelada (Murashige y Skoog, 1962; Vasil y Hildebrandt, 1966 tomado de George y Sherrington, 1984). Muchos medios contienen alrededor de 0.1 mM de Fe. Murashige y Skoog (1962) incluyen 0.1 mM de $FeSO_4$ y 0.11 mM de Na_2EDTA por litro de medio. El exceso de EDTA presente puede quelar otros metales en el medio (Singh y Krikorian, 1980).

El cobalto fue incluido por Murashige y Skoog (1962) ya que es esencial en el metabolismo vegetal (Salisbury, 1959). Es el componente metálico en el complejo vitamina B_{12} ; dicha vitamina es esencial en la fijación del nitrógeno (Kite, 1987).

Cabe señalar que los medios de cultivo conocidos difieren entre sí por las cantidades y fuentes de iones; por ejemplo, el Medio MS desarrollado por Murashige y Skoog 1962 para tabaco, que contiene 40 mM de Nitrógeno como NO_3^- y 20 mM como NH_4^+ . Dicho medio revisado dió un incremento en peso seco de callo de 167% más que el medio de Hildebrandt *et al.* (1946) en el tabaco. Lin y Staba (1981), Chaturvedi *et al.* (1978) (tomados de George y Sherrington, 1984) entre otros autores se han basado en el medio MS para formular sus medios. Shenk y Hildebrandt (1972) definieron el medio SH para la inducción y cultivo de callo tanto para plantas

monocotiledóneas como para dicotiledóneas, este medio presenta una concentración iónica similar a la del medio Gamborg *et al* (1968), con niveles altos de Ca ⁺⁺, Mg ⁺⁺ y P, pero que cualquier aumento en las concentraciones de estos iones produce precipitados así como decremento en el crecimiento del cultivo. El medio N₆ descrito por Chu *et al* en el año 1975 y desarrollado para estudio comparativo de cultivo de anteras de varias especies vegetales, presenta N casi a la mitad que el medio MS así como casi el doble de K.

COMPUESTOS ORGÁNICOS

VITAMINAS Y SUPLEMENTOS INDEFINIDOS.

Las vitaminas son sustancias orgánicas necesarias en células vegetales que tienen una función catalítica esencial en el metabolismo.

Las vitaminas más utilizadas en los medios de cultivo vegetales son la tiamina (B1), el ácido nicotínico (niacina o B3), la piridoxina (B6), la riboflavina (B2), el ácido fólico (B9) y biotina (B8). El mio-inositol, azúcar alcohol, estimula el crecimiento y morfogénesis vegetal, por lo que en ocasiones se clasifica dentro de este grupo (George y Sherrington, 1984).

AMINOÁCIDOS

Los aminoácidos proveen a las células vegetales de una fuente disponible de nitrógeno. Así mismo, promueven la embriogénesis somática de diversas especies como zanahoria (Halperin y Wetherell, 1965; Wetherell y Dougall, 1976 tomado de George y Sherrington; Kamada y Harada, 1979), Alfalfa (Walker y Sato, 1981 tomado de George y Sherrington, 1984; Stuar y Strickland, 1984), *Atropa belladonna* (Thomas y Street, 1970), y *Digitalis lanata* (Kuberski *et al.*,

1984). Sin embargo, algunos aminoácidos en especial los aromáticos (la fenilalanina, el triptófano y la tirosina), pueden inhibir el crecimiento (Filner, 1968; Gamborg *et al.*, 1968), por ejemplo en el cultivo de callo de maíz (Sheridan, 1977).

La L-prolina es un aminoácido que diversos autores (Amstrong y Green, 1985; Brar *et al.*, 1979; Fiona *et al.*, 1990) han reportado que induce callos disgregables. Sin embargo, Conger *et al.*, (1987) no adicionan este aminoácido a su medio SH para segmentos de hojas. La L-prolina estimula la embriogénesis somática sólo en maíz, (Amstrong y Green, 1985), o en combinación con serina en cultivos en suspensión de *Dactylis glomerata* (Trigiano y Conger 1987). Otros aminoácidos importantes son la asparagina, la glicina y la serina que promueven igualmente embriogénesis somática en un sistema de maíz (George y Sherrington, 1984).

REGULADORES DE CRECIMIENTO.

Las sustancias de crecimiento vegetal u hormonas vegetales son compuestos orgánicos que se sintetizan dentro de los tejidos vegetales, presentan un papel regulatorio en el crecimiento y desarrollo vegetal y son activos a bajas concentraciones. En la actualidad existen sustancias sintetizadas por el hombre, que al ser aplicadas a las plantas o a tejidos vegetales provocan respuestas similares a las hormonas y son denominados reguladores de crecimiento vegetal. En cultivo de tejidos se utilizan principalmente dos tipos de reguladores de crecimiento, auxinas y citocininas (Moore y Thomas, 1989).

• Auxinas.

Las auxinas son sustancias que ejercen un efecto fisiológico similar al del AIA, la primera auxina descubierta. Pueden ser clasificadas como compuestos indólicos, los fenoxiácidos, los ácidos naftalenacéticos o ácidos benzóicos (Moore y Thomas, 1989).

Las auxinas naturales son producidas en zonas meristemáticas de tallos y transportadas hacia abajo en el tallo a otras partes de la planta. La concentración de auxina difiere de planta a planta, en los diferentes tejidos, la estación del año y en la etapa de crecimiento de la planta. Se han encontrado ampliamente distribuidas en plantas con y sin semilla así como en bacterias, hongos y algas. (Moore y Thomas, 1989)

Estos compuestos están implicados en procesos fisiológicos tales como la elongación celular, geotropismo, fototropismo, dominancia apical, iniciación de raíz, desarrollo de frutos, puede inhibir o promover (vía estimulación de etileno) abscisión de hojas y frutos, partenocarpiya y expresión del sexo y en altas concentraciones estimula la producción de etileno. (Moore y Thomas, 1989)

En cultivo de tejido vegetal, promueve el crecimiento de callo, de células en suspensión y órganos (tales como meristemas de tallos o raíces). En combinación con citocininas, estimula diferenciación de floema y xilema; así mismo, induce la formación de raíz en cortes de tallo y desarrollo de raíces laterales (Davies, 1995; Salisbury y Ross, 1992).

El 2,4-D, auxina sintética, es un iniciador o inductor de la división celular, mediante la activación de un sistema de cascada de señales, el cual involucra la unión del ligando (el 2,4-D) a receptores en plasmalema, retículo endoplásmico y tonoplasto; segundos mensajeros como son fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato, Ca_2^+ y AMPc; e integrantes de la cadena de transducción de señales entre ellos proteínas G, fosfolipasa C, protein cinasa y ciclinas, que da lugar a que la célula re programe su expresión génica así como que reorganice la estructura de su citoesqueleto (Ommrod y Francis, 1993).

El 2,4-D ha sido ampliamente utilizado en cultivo de tejidos de Gramíneas en la inducción de callo utilizando embriones inmaduros de *Triticum aestivum*, L (Fiona *et al.*, 1990), en segmentos de tallo y hoja (Green *et al.*, 1974), embrión inmaduro y plántulas para formación de callo de

sorgo (Brar *et al.*, 1979) para callo de maíz originado de embrión maduro así como de secciones de tallo de plántulas (Sheridan, 1977).

- **Citocininas.**

El término citocinina fue propuesto por Skoog y colaboradores y define a un grupo de compuestos que promueven la citocinesis en las células vegetales y producen efectos similares a aquellos producidos por la cinetina (Moore, 1989). Son compuestos con una estructura parecida a la base adenina. En la actualidad se han identificado alrededor de 200 tipos de citocininas; entre las naturales se encuentra la zeatina 6-(4-hidroxy-3-metil-tans-2-butenil-amino(purina), la cual fue aislada de granos de maíz *inmaduros* y las sintéticas como es la Cinetina (6-furfurilaminopurina).

Las citocininas naturales se encuentran en altas concentraciones en regiones meristemáticas y tejido en crecimiento y división como son raíces, hojas jóvenes, frutos en desarrollo y semillas. Están ampliamente distribuidas en plantas superiores, musgos, hongos, bacterias y en muchos procariontes (Salisbury y Ross, 1992).

La manifestación fisiológica producida por la planta en respuesta a la aplicación de las citocininas depende tanto de la especie como del tipo de citocinina aplicada (Davies, 1995; Salisbury y Ross, 1992). Entre los efectos que produce dicha aplicación *in vivo* se encuentran el aumento de la apertura estomática y se fomenta la inducción de morfogénesis de cloroplastos. Otros efectos son división celular y formación de órganos, germinación de semillas, alargamiento de células y órganos, iniciación y crecimiento de raíz, desarrollo de yemas y tallos, retardo de la senescencia y promoción de la translocación de nutrientes y sustancias orgánicas. En cultivo de tejido *in vitro* las citocininas estimulan la división y expansión celular, la morfogénesis, así como el crecimiento de yemas (George y Sherrington, 1984).

TIPOS DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

CULTIVO DE CALLO

El tejido callogénico (callo) se define como una masa amorfa de tejidos desdiferenciados, de morfología y coloración variable (Hurtado y Merino, 1988). Se caracteriza por tener proliferación continua acelerada y carente de organización, así como por estar constituido de un solo tipo de células (callo homogéneo) o de varios tipos celulares (callo heterogéneo), se obtiene a partir de fragmentos de tejido de zonas no diferenciadas (Thorpe y Brown, 1978 tomado de George y Sherrington, 1984; Brown, 1990).

El callo ha sido utilizado ampliamente como un modelo biológico en investigación en fisiología celular (Savidge, 1983), estudios de organogénesis (Dixon, 1985; George y Sherrington, 1984), embriogénesis (Turnham y Northcote, 1982), y genética entre otros (Aschmore y Gould, 1981).

El callo puede ser obtenido de cambium, cortex, médula, floema secundario y aún xilema. La inducción y proliferación tienen lugar en presencia de auxinas fuertes tales como el ANA, 2,4-D, Dicamba, etc., así como con una citocinina en menor proporción que estimule la división celular.

La inducción tarda de 3 a 8 semanas para dar lugar a la formación de callo, momento en el cual éste será subcultivado, transfiriendo pequeñas piezas de tejido (50-100 mg) a medio fresco y una vez que el callo ha sido establecido, debe ser subdividido y subcultivado a intervalos regulares hasta obtener suficiente material disponible para experimentación (Dixon, 1985).

Las condiciones de incubación para los cultivos de callos son 25° C de temperatura y baja intensidad lumínica (Dixon, 1985).

La cinética de crecimiento de los cultivos de callos es cuantificada mediante el incremento de peso fresco y seco aunque existen otros parámetros tales como número y volumen celular y nitrógeno insoluble contra el tiempo (Butcher e Ingram., 1974).

En el cultivo de callo, la división celular está confinada a la periferia del tejido (Aitchison *et al.*, 1977 tomado de Street, 1977). La proliferación se localiza generalmente en nódulos o en zonas meristemáticas superficiales y es el resultado de la división periclinal. La formación de estas secciones proliferantes se da gracias a que conforme la tasa de división cae, el plano de división del tejido se altera dando inicio a la actividad meristemática sólo en ciertas secciones y así iniciando la formación de nódulos (Street, 1977).

En cultivo de callos esta fase se asocia con el cese de la división celular. La tasa de respiración declina y la síntesis de RNA y contenido y la actividad de enzimas claves de la vía de las pentosas fosfato decrece (Khaukin y Varakina, 1981). En muchos casos, si el medio nutritivo consumido no es reemplazado, puede ocurrir diferenciación celular. Esto podría involucrar la actividad de regiones meristemáticas dentro del cuerpo del cultivo del callo, llevando a la regeneración de órganos, lo cual está asociado al incremento en producción de metabolitos secundarios. Thomas y Street (1970) encontraron morfogénesis en cultivo en suspensión de *Atropa belladonna* y producción del alcaloide tropina. Nikoleava y Vollosovich (1972), encontraron alcaloides por *Datura spp.* y alcaloides indólicos de *Rauwolfia serpentina*. En algunas especies, la agregación celular decrece (King, 1980) acumulándose compuestos fenólicos a un nivel máximo.

CULTIVO DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN

Los cultivos en suspensión son una población casi homogénea de células que puede ser expuesta uniformemente a la aplicación de agentes químicos. Tales cultivos crecen bajo condiciones definidas y asépticas (Butcher e Ingram., 1974).

En general, el hecho que los cultivos en suspensión estén formados por conglomerados celulares más que de células aisladas (*Sycamore spp*), es una restricción en el uso de estos cultivos para estudios bioquímicos de diferenciación (Butcher *et al.*, 1974). Sin embargo, los cultivos en suspensión han sido utilizados ampliamente en estudios bioquímicos de vías de metabolitos secundarios, inducción enzimática y expresión génica, así como degradación de xenobióticos y como una fuente de material de purificación de enzimas; así mismo en la caracterización de mutantes. Según Dixon (1985), la falta de clorofila y carotenoides en muchos cultivos de células en suspensión benefician grandemente las investigaciones que involucran el aislamiento de enzimas o productos secundarios.

Nickell (1956) tomado de George y Sherrington, 1984. fue el primero que demostró la posibilidad de crecer células en suspensión como un cultivo de microorganismos; así mismo, aplicó las técnicas para el estudio de microorganismos (técnicas de fermentación microbiana, de estudios en cinética de crecimiento, en composición bioquímica y producción de metabolitos particulares) a los cultivos en suspensión utilizando como modelo células de hipocótilo de frijol *Phaseolus vulgaris* (Tulecke y Nickell, 1960; Tulecke y Nickell, 1959).

En la actualidad se han desarrollado cultivos en suspensión de especies diversas tales como *Nicotiana tabacum* (Carlson, 1970), *Daucus carota* (McWilliam et al, 1974), de tejido normal y tumoral de *Picea Glauca* (Reinert, 1956 tomado de George y Sherrington), y de tejido haploide de *Antirrhinum majus* (Melchers y Bergmann, 1959 tomado de Street, 1977) entre otros.

Los cultivos de células en suspensión deben estar en constante agitación para con ello mantener a las células distribuidas en el medio de cultivo de tal forma que todas reciban los nutrientes necesarios para su supervivencia, además de permitir la oxigenación del medio, así como la excreción de sustancias volátiles que pueden ser tóxicas al cultivo. El cultivo puede ser mantenido y propagado por inoculaciones de un volumen de cultivo madre establecido en intervalos de tiempo determinados (Butcher e Ingram, 1974).

El crecimiento de cultivos en suspensión puede ser evaluado a partir de mediciones de uno o varios de los siguientes parámetros: paquete del volumen celular, número de células, peso fresco y seco, contenido de proteínas y DNA total, conductividad del medio, viabilidad celular, etc. La cinética de crecimiento del cultivo en suspensión, obtenida a partir de estos parámetros es de tipo sigmoideal (Street, 1977; Hurtado y Merino, 1988). La curva presenta las siguientes fases (Figura 3): la primera es la fase lag o de reposo, el inóculo no presenta ninguna señal de división celular, ya que únicamente se está adaptando a las nuevas condiciones de nutrición para posteriormente iniciar e incrementar la velocidad de división celular durante las fases exponencial y lineal (tasa de crecimiento con aceleración constante) y una tercera fase de declinación de la tasa de crecimiento que es donde los nutrientes (nitrato y O_2) del medio de cultivo se han terminado. La duración y amplitud de la curva depende de la especie, condición del tejido, etc. (Hurtado y Merino, 1988).

La fase lag es una etapa preparatoria para las fases posteriores y se caracteriza por incremento en los niveles de NADPH y ATP, en la actividad glucolítica y vía de las pentosas fosfato (Fowler, 1971), así como actividad de invertasa que está asociada a la síntesis de pared celular (Copping y Street, 1972) y un incremento en el contenido de ARN celular (Kanamori *et al.*, 1979). La tasa de síntesis proteica también se incrementa durante esta fase y es debida a una más eficiente capacidad ribosomal (Verma y Marcus, 1974). En células de *Sycamore* se sintetiza nucleótidos libres tales como UDP-glucosa y ATP durante esta fase y es posible que sean una preparación

para la síntesis subsecuente de polisacáridos de pared celular y como una fuente de energía requerida en procesos involucrados en división celular. La síntesis neta de nucleótidos cesa muy rápidamente posterior a la división (Brown y Short, 1969 tomado de Street, 1977).



Figura 3. Curva esquemática de Crecimiento de cultivos en suspensión

Bevan y Northcote en 1981 encontraron que los subcultivos estimulan la formación e incremento de los niveles de polisomas, así como incrementan la transcripción de un pequeño grupo de RNAm en *Phaseolus vulgaris* y *Glycine max*. El incremento en RNAm para ciertas proteínas es dependiente de los reguladores de crecimiento 2,4-D y ANA, en células subcultivadas y originadas en 2,4-D (Bevan y Northcote 1981).

Schöder *et al.*, (1978), dicen que la actividad sintética de la fase lag podría estar determinada por la composición del medio nutritivo, pues no se encontró efecto alguno de dilución en la tasa de incorporación de precursores marcados en proteínas después de las 25 h.

Posterior a la fase lag se identifica la etapa exponencial. Una vez que la división celular ha sido inducida, la fase exponencial procede rápidamente y si se adiciona medio fresco, podrá continuar. El incremento en el número celular generalmente se mantiene más allá del

incremento en el peso fresco, resultando en un agudo decremento en el tamaño celular promedio.

En cultivos en suspensión hay poca diferenciación (sea organización celular o citodiferenciación) durante la fase exponencial, las células se parecen a las células meristemáticas de ápices de tallos. Hay evidencia que la coloración verde en células que se dividen rápidamente decrece. Lindsey y Yeoman, (1983) y Laetsch y Stetler (1965) demostraron que las células de tabaco en esta fase contienen cloroplastos poco desarrollados.

En la fase tardía de la división celular, cuando las células comienzan a incrementar su volumen, se presenta un pico de producción de etileno, esto se ha observado en células de *Sycamore* (Mackenzie y Street, 1970 tomado de George y Sherrington, 1984).

Durante la fase estacionaria propiamente dicha, el peso seco disminuye (Hurtado Merino, 1988), las células han alcanzado su máxima densidad celular y permanecen viables pero sin división. La estabilidad de las células en esta fase depende de la especie y de la naturaleza del factor limitrofe al crecimiento (Hurtado y Merino, 1988).

CICLO CELULAR

La capacidad de una célula para producir réplicas exactas de sí misma, es una característica de la vida celular. Este proceso requiere una gran fidelidad entre organismos y entre especies a propagar. La maquinaria molecular del control del ciclo celular que las células utilizan para replicarse está altamente organizado y conservado a través de la evolución.

El concepto de ciclo celular se aplica tanto al reino animal como vegetal. Integra muchos eventos bioquímicos necesarios para la duplicación cromosómica, transmisión y separación celular y es un proceso cíclico en el cual, la célula parental pasa por una serie de fases de síntesis para que eventualmente se divida dando lugar a dos células hermanas, las cuales en una división mitótica son idénticas a la célula original (Lewin, 1997).

El ciclo celular está conformado de dos fases funcionales y dos fases preparatorias. Las fases funcionales del ciclo son la copia precisa del ADN, conocida como la fase S o de replicación, y la segregación del total duplicado de cromosomas entre las células hermanas en la fase M o mitosis y las preparatorias son conocidas como G₁ y G₂ (Pardee, 1989).

Las células se preparan bioquímicamente para la fase S en una fase preparatoria conocida como G₁ (Gap 1) durante la cual se sintetizan ARNs y proteínas. Existen tres puntos de control en esta fase preparatoria, los puntos C, V y R. A partir de este último, conocido como punto de restricción R en células animales, o Start en levaduras, la célula evidentemente progresa hacia la fase S, y está programada para concluir el ciclo completo. Este punto R sirve como referencia para identificar eventos que ocurren tempranamente en G₁(antes de R) y aquellos tardíos (después de R) (Pardee, 1989).

La otra fase preparatoria conocida como fase G₂ (Gap 2), prepara a la célula para entrar a mitosis y presenta otro punto de control entre G₂ / M.

Las células que no están dividiéndose activamente, pueden tender hacia diferenciación terminal o detenerse en un estado no cicante conocido como G₀. Los factores extracelulares (como nutrimentos) determinan si una célula quiescente (G₀) comenzará a proliferar y también si una célula normal proliferante en G₁ continúa al ciclo o regresa a quiescencia (Pardee, 1989).

Este orden de eventos es controlado por una serie de mecanismos de control ya sea mediante síntesis, degradación, activación por fosforilación y desfosforilación, así como la presencia de inhibidores de proteínas del ciclo celular (ciclínas y cinasas), que aseguran el orden de los eventos, y que si son eliminados por mutación dan lugar a muerte celular (Henar, 1996).

La replicación segura y correcta de la secuencia de ADN es confinada a la fase específica del ciclo celular denominada fase S. En un ciclo celular somático típico, el paso a través de esta fase resulta en la duplicación de la cantidad del contenido de ADN de los niveles 2C a un nivel 4C, donde 1C es la cantidad de ADN contenido dentro de un genoma haploide. Las histonas también son sintetizadas aquí, así que la cromatina es reensamblada en la cadena de ADN naciente conforme progresa la replicación (Lewin, 1997).

Las regiones de inicio de la replicación, denominadas replicones son unidades de DNA en los cuales se da lugar a un acto individual de replicación y que se enciende sólo una vez por ciclo. Presentan elementos de control necesarios para la replicación y tienen un origen o sitio que actúa en cis y afecta la molécula en la cual reside. Asimismo, reúne una maquinaria relativamente compleja, conjunto de enzimas y proteínas como son las polimerasas dependientes de templado de ADN, primasas, helicasas, que separan las cadenas del dúplex ADN, proteínas de unión a cadena sencilla, así como factores de regulación que en conjunto trabajan en la duplicación del ADN (Lewin, 1997).

La replicación se divide en tres fases: la primera es la fase de iniciación donde un complejo enzimático reconoce el sitio de origen de la replicación; la enzima helicasa separa el dúplex de ADN, y proteínas se unen a la cadena sencilla proporcionando al dúplex estabilidad. La segunda es la fase de elongación, donde se sintetizan las cadenas líder y rezagada propiamente dichas; también se requieren las mismas enzimas. Y por último, la fase de terminación que es cuando las horquillas de replicación se encuentran (Lewin, 1997).

La replicación (evento semiconservativo y antiparalelo) es llevada a cabo por las enzimas denominadas ADN polimerasas. Son las enzimas que sintetizan la cadena complementaria del ADN. Catalizan la reacción de incorporación de nucleótidos mediante el ataque nucleofílico del grupo OH 3' del azúcar con el fosfato en 5' del nucleótido trifosfatado entrante, liberando PPI y elongando la cadena en dirección 5' 3'. El pirofosfato producido es hidrolizado a fosfato inorgánico llevando a la reacción hacia el alargamiento de la cadena (Lewin, 1997).

Las células eucarióticas presentan tres tipos de polimerasas replicativas, las α , δ y ϵ . La existencia de polimerasas α en plantas ya ha sido establecida en chícharo, pero los autores puntualizan que es probable que sea una mezcla de complejo polimerasa- α que lee la cadena rezagada y polimerasa- δ que lee la cadena líder (Bryant *et al.*, 1992).

En ejes embrionarios en germinación de maíz han sido separadas tres actividades de ADN polimerasa y han sido denominadas polimerasas 1, 2 y 3, de acuerdo a su orden de elución (Coello *et al.*, 1992). Todas requieren cationes bivalentes para su actividad. Las ADN polimerasas 1 y 2 son inhibida por N-etil maleimida y afidicolina (inhibidores de enzimas replicativas). Mientras que la ADN polimerasa 3 se inhibe por bajas concentraciones de ddTTP (un inhibidor de enzimas tipo reparativo) (García *et al.*, 1997).

La ADN polimerasa 2 ha sido caracterizada como una fosfoenzima (Coello y Vázquez., 1995a), con una procesividad de 12-22 nucleótidos por evento de unión (Coello y Vázquez., 1995b). Presenta una masa molecular de 450 Kda, holoenzima de 7 subunidades de 90, 83, 70, 60, 55, 45 y 24 Kda; es inmunoinhibida por anticuerpos contra ADN polimerasa α de timo de temera y se cree que es una enzima tipo α ya que posee una actividad de ADN primasa característica de este tipo de enzimas (García *et al.*, 1997).

Mitosis y citocinesis (fase M del ciclo celular) son separadas de la replicación del ADN por la fase G2; La duración de cada fase depende de la especie, condiciones de crecimiento y localización dentro de la planta (McIntosh y Koonce., 1989).

La fase funcional denominada Mitosis, es el proceso por el cual las células eucarióticas aseguran la equipartición de sus cromosomas en la división celular. Está formada de cinco fases: La Profase, donde se condensan los cromosomas duplicados unidos al centrómero para su transporte. Se ensambla el huso mitótico; el citoesqueleto y la envoltura nuclear desaparecen. En la Prometáfase los microtúbulos cromosómicos se fijan al cinetocoro de los cromosomas y cada cromosoma condensado se desplaza hacia el ecuador del huso. En la metafase los cromosomas se alinean a lo largo de la placa metafásica, unidos por microtúbulos cromosómicos a ambos lados. La Anafase, es donde tiene lugar la separación de las cromátidas hermanas, seguidas por su movimiento hacia el extremo opuesto de la célula. Y por último Telofase donde se reestructura el núcleo y se da la posterior descondensación de los cromosomas para restablecer la condición de interfase para posteriormente dar lugar a dos núcleos interfásicos completándose los procesos de cariocinesis (McIntosh y Koonce., 1989). La citocinesis, proceso en el cual se separan físicamente las dos células hijas, comienza en anafase tardía-telofase inicial, con la formación de la placa celular alineada en el plano ecuatorial de la placa previa del anafase, llamada fragmoplasto en células vegetales. Pequeñas vesículas originadas del RE-Golgi se mueven hacia el fragmoplasma y son el material con que se construye la placa celular que dará origen a la pared celular (Lewin, 1997)

ANTECEDENTES DE CULTIVOS DE CALLOS EN GRAMÍNEAS.

Se han establecido cultivos de callos de Gramíneas a partir de diversos explantes tales como embriones inmaduros y segmentos de inflorescencias y hojas jóvenes (Conger *et al.*, 1987; Vasil y Vasil, 1982; Vasil y Vasil, 1985).

Conger *et al.*, (1987) y Green *et al* (1974) obtuvieron callo originado de hojas jóvenes y de secciones de plántulas de *Zea mays* L. var. 'Golden Bantam', así como de segmentos de tallo y hoja de plántulas de maíz de 17 híbridos y 23 cruzas respectivamente.

El callo originado de monocotiledóneas se ha clasificado basándose en su consistencia y capacidad regenerativa en Callo Tipo I, ha sido observado también por diversos autores (Lu *et al.*, 1982, 1983; Novak *et al.*, 1983), y se caracteriza por ser compacto, nodular, organizado y con bajas tasas de división celular (es de lento crecimiento). Este tejido es por lo general embriogénico no disgregable, y ha sido utilizado para establecer cultivos de células en suspensión embriogénicas dispersas y totipotentes, las cuales son fuente de protoplastos totipotentes en Gramineae (Vasil y Vasil, 1980; Lu *et al.*, 1981; Vasil *et al*, 1983; Heyser, 1984; Srinivasan y Vasil 1985).

Este callo Tipo I en maíz presenta corta vida y es difícil de mantener después de pocos subcultivos a causa de la organización masiva y embriogénesis somática (Lu *et al.*, 1982). Sin embargo, en otras especies, el callo de este tipo puede ser mantenido en cultivo por largos periodos de tiempo, por selección y transferencia exclusivamente de callo embriogénico a medio fresco (Chandler y Vasil, 1984; Vasil y Vasil, 1985). Se ha observado que el tejido que da lugar a este tipo de callo es preferentemente embriones inmaduros de cultivares híbridos y líneas mejoradas.

El Callo Tipo II se caracteriza por ser suave, disgregable y es de rápido crecimiento (alta tasa de división celular), y ha sido descrito en maíz (Green *et al.*, 1983 tomado de Downey *et al.*, 1983; Armstrong y Green, 1985; Vasil *et al.*, 1984; Vasil y Vasil, 1985). Este tipo de callo presenta potencial embriogénico por largos periodos, comparado con el callo tipo I (Lu *et al.*, 1982) y es obtenido ya sea directamente del escutelo del embrión inmaduro como un callo primario, o como sectores que ocurren espontáneamente dentro del cultivo de callos establecidos. Armstrong y Green (1985) encontraron que la adición de L- prolina al medio N_6 causa un incremento lineal en la capacidad de embriogénesis somática y la formación de Callo tipo II de embriones cultivados de la línea A-188. Sin embargo, Vasil y Vasil (1985) no observaron tal correlación.

El Callo Tipo III también es disgregable, rizogénico y sin potencial embriogénico; presenta diferenciación hacia estructuras parecidas a raíces (Vain *et al.*, 1989).

ANTECEDENTES DE CULTIVOS EN SUSPENSIÓN DE GRAMÍNEAS

Se han establecido cultivos embriogénicos en suspensión en muchas especies de Angiosperma. Sin embargo, en gramíneas solamente se han obtenido y estudiado suspensiones no morfogénicas en unas pocas especies (Gamborg y Eveleigh, 1968; Oswald *et al.*, 1977; Shannon y Lui, 1977; Vasil y Vasil, 1979; Brar *et al.*, 1979; Polikarpochmina *et al.*, 1979; Potrikus *et al.*, 1979).

Pocas veces se han podido establecer verdaderas líneas celulares en suspensión. En muchas ocasiones, los cultivos consisten de meristemos de raíz que proliferan para posteriormente alargarse, vacuolarse y que generalmente ya no se dividen (King *et al.*, 1978; King, 1980) y son mantenidos en suspensión por agitación rápida. Tales cultivos no pueden ser verdaderamente

descritos como suspensiones y no son útiles para cultivos de células, regeneración de plantas o el estudio de genética de células somáticas.

La disponibilidad de cultivo de callo embriogénico de las gramíneas ha llevado al establecimiento de cultivos de células en suspensión totipotentes de muchas especies (Vasil y Vasil, 1981, 1982; Lu y Vasil, 1981; Vasil *et al.*, 1983; Ho y Vasil, 1983). Tales suspensiones proveen un medio de rápida propagación clonal a gran escala pero más importante, pueden ser usadas efectivamente para el aislamiento de variantes (Rangan y Vasil, 1983) o líneas celulares mutantes, y actualmente son la única fuente de protoplastos totipotentes en las Gramíneas (Vasil y Vasil, 1980; Lu *et al.*, 1981 a; Vasil *et al.*, 1983).

En la actualidad han sido establecidos cultivos embriogénicos en *Pennisetum americanum* (Vasil y Vasil 1982, 1981); *P. purpureum* (Vasil *et al.*, 1983); *Panicum maximum* (Lu *et al.*, 1981) y *Saccharum officinarum* (Ho *et al.*, 1983).

III OBJETIVOS E HIPÓTESIS

OBJETIVO GENERAL:

Optimización de cultivos de células en suspensión de maíz y su caracterización a través de parámetros físicos y bioquímicos.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1. Seleccionar el medio de cultivo óptimo (macronutrientes, L-prolina) y tipo de explante (segmento de tallo y hoja (STH), eje embrionario maduro (EE) y embrión maduro completo (EC) que proporcionen callo disgregable prolífero de maíz.**
- 2. Seleccionar cultivos en suspensión con altas tasas de crecimiento producidos a partir de los diferentes explantes y medios de cultivo distintos.**
- 3. Caracterización de cultivos de células proliferativas en cuanto a:**
 - Parámetros Físicos**
 - Peso Fresco**
 - Peso Seco**
 - Parámetros Bioquímicos**
 - Cuantificación de Proteínas totales**
 - Síntesis de ADN**

HIPÓTESIS

H: La proliferación de las células en suspensión de maíz (*Zea mays*, L. raza Chalqueño) depende del tipo de explante, así como de la relación nitrato:amonio y la concentración de citocininas o auxinas.

IV MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en las Instalaciones del Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales y el Laboratorio 114 del Departamento Bioquímica, Facultad de Química de la UNAM.

Para el cumplimiento de los objetivos del presente trabajo, la parte experimental se llevó a cabo en tres etapas a saber: Etapa I, Establecimiento de los cultivos *in vitro*, Etapa II, Establecimiento y evaluación del cultivo de callos y Etapa III, Establecimiento y evaluación de cultivos de células en suspensión. En cada etapa se llevaron a cabo procedimientos distintos como se presentan en la figura 4.

ASPECTOS GENERALES

MATERIAL BIOLÓGICO.

Se utilizó como material biológico embriones maduros, ejes embrionarios y segmentos de tallo y hoja de maíz (*Zea mays*, L.) raza Chalqueño (Ver figura 5 y 6).

Las semillas fueron seleccionadas según el tamaño, forma y coloración más representativo de cada raza, así como sin manchas que pudieran ser indicios de alguna enfermedad, asegurando con ello material sano.

RUTA EXPERIMENTAL

ETAPA I.
ESTABLECIMIENTO DE LOS
CULTIVOS *IN VITRO*

ESTERILIZACIÓN Y DISECCIÓN DE SEMILLA.

EMBRIONES MAJORS

EMBRIONES MENORES

PLANTULA ENTERA

SEGMENTOS DE
TALLO Y HOJA

ETAPA II.
ESTABLECIMIENTO Y
EVALUACIÓN DE
CULTIVOS DE CALLOS

INDUCCIÓN DE CALLOS

PROLIFERACIÓN

DE PARÁMETROS FÍSICOS

ETAPA III.
ESTABLECIMIENTO Y
EVALUACIÓN DE CULTIVOS DE
CÉLULAS EN SUSPENSIÓN

ESTABLECIMIENTO

SUBCULTIVOS

EVALUACIÓN A TRAVÉS
DE PARÁMETROS FÍSICOS
Y BIOQUÍMICOS

Fig. 4 Ruta experimental para la obtención de cultivos de callos y células en suspensión de maíz raza Chalqueño.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVOS

Los medios de cultivo utilizados se prepararon a partir de soluciones concentradas 100 x (Apéndice 1), siendo éstos el medio de Murashige y Skoog(1962) conocido como MS; el medio de Chu *et al.*, (1975), conocido como el N₆; el medio SH de Schenk y Hilderbrandt (1972) y el medio R₂, el cual estuvo compuesto con las sales del MS modificado por contener los nitratos a la mitad. Para la germinación de semillas se utilizó el medio MS y para la generación de callo se probaron las sales inorgánicas del N₆, MS, SH y R₂. En los cultivos de células en suspensión se utilizaron N₆ y R₂. En la Etapa II se especifican las variaciones probadas así como la nomenclatura utilizada para los diversos medios.

Los medios de cultivo fueron complementados con 3% de sacarosa, así como distintas concentraciones del aminoácido L- prolina y reguladores de crecimiento como se especificará en cada etapa.

Todos los medios se ajustaron a pH 5.7 con NaOH 1 N y HCL 1 N. Se utilizó como agente gelificante Gellan al 0.25%. Los medios de cultivo se vertieron en tubos de ensaye de 15 x 2.5 cm, en cajas de petri de 10 x 5 cm o en frascos de alimento infantil con 15 ó 20 ml según el caso y se esterilizaron a 1.2 mm Hg/cm² de presión y a una temperatura de 121°C durante 18 minutos.

Tanto el proceso de esterilización y disección de embriones así como de siembra de callos y suspensiones se llevó a cabo bajo condiciones de acepsia total en una campana de flujo laminar.

Todo el material utilizado fue esterilizado en autoclave vertical a 1.2 mm Hg/cm² de presión y a una temperatura de 121°C durante 30 minutos.

INCUBACIÓN DE CULTIVOS *IN VITRO*.

Los cultivos tanto para germinación como de callos y células en suspensión se mantuvieron bajo condiciones de temperatura y fotoperiodo controlados. Para su germinación las semillas se incubaron en un cuarto de ambiente controlado a 25 ± 2 ° C de temperatura y fotoperiodo de 16 h luz y 8 oscuridad utilizándose tubos de luz fría con $29 \mu\text{m. s}^2$ de intensidad lumínica. Los cultivos de callo se mantuvieron a la misma temperatura pero en oscuridad y las células en suspensión se cultivaron en un incubador a 25 °C en oscuridad y con agitación de 100 r.p.m.

ETAPA I ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO.

MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN

El uso de los agentes desinfectantes tales como alcohol, hipoclorito de sodio y Tween 20 para la desinfección de las semillas han sido utilizados ampliamente en los procesos de esterilización superficial de este explante, así como de material crecido *in vivo*. La concentración de dichos desinfectantes, así como el tiempo de exposición del explante a dichos compuestos, están en función de la resistencia del material vegetal a los diversos compuestos (Sweet y Bolton, 1979).

Ya seleccionadas las semillas, se les eliminó la porción que los une al ote (hilio), después en la campana de flujo laminar se desinfectaron durante un minuto en alcohol al 70%, posteriormente se transfirieron a una solución de hipoclorito de sodio comercial (Cloralex ®) al 50 % (V/V) más 6.8 ml de solución coloidal de plata (Microdine ®) y 3 ml de surfactante (Tween 20) por litro, de donde permanecieron en agitación constante, durante 20 minutos. Finalmente se pasaron a una solución con fungicida (Captan ® $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) durante 20 minutos.

Después de cada tratamiento las semillas se enjuagaron tres veces con agua desionizada estéril y se colocaron en cajas petri conteniendo una cama de papel absorbente y agua estéril, se incubaron a 4°C de temperatura durante 48 horas en oscuridad.

TIPOS DE EXPLANTE

En cuanto a la obtención de los distintos explantes, se siguió el método establecido de Méndez (1998) para embrión maduro y eje embrionario; para la obtención de segmentos de tallo y hoja (STH) se siguió el método citado por Conger *et al.* (1987); se modificó en algunas secciones como es en el hecho de utilizar plántulas de maíz crecidas *in vitro*, ya que esto minimiza la contaminación producida por los explantes obtenidos de plántulas germinadas en invernadero.

A partir de las semillas y plántulas se obtuvieron tres tipos de explantes: Embrión Completo (EC), eje embrionario (EE) y segmentos de tallo y hoja (STH) (Figura 5 y 6). Los embriones fueron disectados de dos formas según la finalidad: la primera, para la obtención de plántulas y callo de embrión completo (EC), y la segunda para la obtención de ejes embrionarios. En el primer caso, los embriones fueron disectados eliminando el endospermo harinoso y la cubierta de la semilla; para el segundo, la disección de ejes embrionarios (EE), se logró siguiendo el procedimiento anterior pero, además, se eliminó cuidadosamente el escutelo, evitando dañar el eje, como se muestra en la Figura 6.

DISCOS DE TALLO Y HOJA (STH):

OBTENCIÓN DE PLÁNTULAS. Los embriones fueron sembrados verticalmente, introduciendo la región del meristemo radicular 3 mm dentro del medio de cultivo (Figura 5), en tubos de ensayo conteniendo 10 ml de medio MS (Sales minerales y vitaminas).

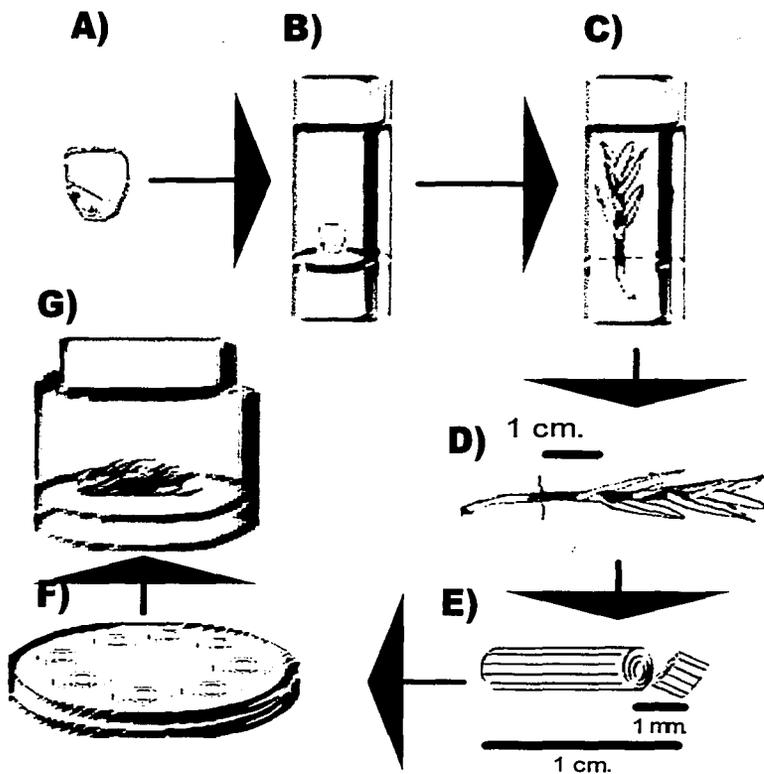


Figura 5.- Protocolo para la obtención de callo originado de segmentos de tallo y hoja (STH) de maíz raza Chalqueño. A) Semilla de maíz previamente esterilizada, B) Siembra de la misma en medio de cultivo correspondiente, C) Desarrollo de la plántula de maíz *in vitro*, D) Selección de plántulas de 15 centímetros de largo, con 5-7 fitómeros, E) Disección de los Segmentos de 1 mm. de grosor de tallo y hoja, F) Siembra de los STH en cajas de petri con medio de cultivo, G) Callo obtenido de dicho tejido.

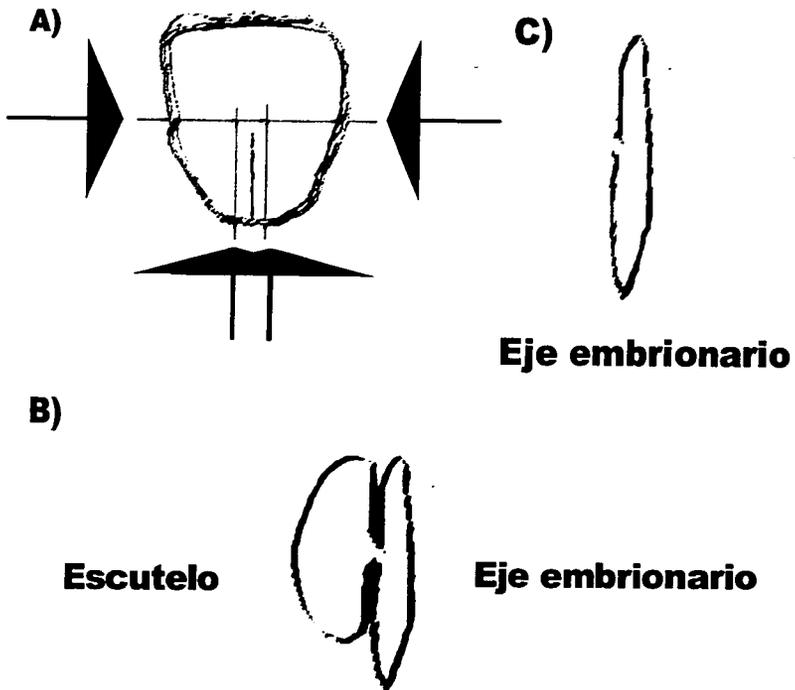


Figura 6.- Disección de Embrión maduro completo (EC) y Eje embrionario. A) Cortes en la semilla de maíz, B) Embrión Maduro Completo, compuesto de escutelo y eje embrionario, C) Eje embrionario. Eliminación del Escutelo.

OBTENCIÓN DE DISCOS DE TALLO Y HOJA. Lotes de plántulas de 15 días de germinación, de tamaño representativo fueron seleccionados para disectar segmentos transversales de 1 mm de grosor de tallo y hoja de la sección superior del primer entrenudo. Diez a doce segmentos del mismo individuo fueron sembrados siguiendo su polaridad en caja petri 10 x 5 cm con 8 ml del medio.

EMBRIONES CON ESCUTELO (EC): Fueron sembrados cinco EC en frascos con 20 ml del medio, colocando el eje en contacto con el medio (Figura 8).

EJE EMBRIONARIO (EE): Se colocaron horizontalmente cinco ejes en la superficie del medio en frascos conteniendo 20 ml del medio (Figura 8).

ETAPA II INDUCCION, PROLIFERACIÓN Y MANTENIMIENTO DE CALLO.

En esta etapa se probaron distintas formulaciones ya que en gramíneas se han establecido cultivos tanto de callos como células en suspensión a partir de distintos medios, tal es el caso del medio N₆ utilizado por Armstrong y Green en 1985 para embriones inmaduros de maíz, así como de protoplastos propuesto por Prioli y Söndahl en 1989. El medio SH se ha utilizado exclusivamente en el cultivo de segmentos de hojas (Conger *et al.*, 1987). El medio MS ha sido utilizado ampliamente para embriones y plántulas de varias líneas de sorgo, así como para cultivo de suspensiones de maíz (Brar *et al.*, 1979), y de trigo (Flona *et al.*, 1990). Así mismo la generación de callos se ha realizado con distintos explantes y en distintas líneas o híbridos; es por ello que para el caso de la raza Chalqueño fue necesario determinar el medio de cultivo, el explante y la cantidad de L-prolina, auxina y citocininas para la obtención de callos y células en suspensión prolíferas.

MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS EN INDUCCIÓN Y PROLIFERACIÓN

Los medios utilizados en la inducción y proliferación de callo se observan en el cuadro 1. Los medios de inducción corresponden a los C1, C2, C3, C4 y C5-0 y los de proliferación a C5 y C6. Los medios de inducción contenían $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de 2,4-D mientras que a los de proliferación se le adicionó $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; a estos últimos se les agregó $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de la citocinina BAP.

Todos los medios se complementaron con $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de caseína hidrolizada, coctel 20 (una combinación de vitaminas y aminoácidos) (Apéndice I), $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de Sacarosa, $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de adenina sulfatada y una mezcla de antioxidante formada de ácido ascórbico y ácido cítrico, ambos a una concentración de $0.001 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, así como distintas concentraciones de L-Prolina como se muestra en el cuadro 1.

Cuadro 1.- Constitución de los medios de cultivo probados para la inducción y proliferación de Callo.

	MEDIOS DE CULTIVO						
	INDUCCIÓN					PROLIFERACIÓN	
	C1	C2	C3	C4	C5-0	C5	C6
Sales Minerales							
¹ SH	*	*					
² R ₂			*				*
³ MS				*			
⁴ N ₆					*	*	
Otros							
L-Prolina(mM)	0	5	20	20	20	20	20

¹ SH Sales Inorgánicas del Medio Hildebrandt y Schenk (1972)

² R₂ La concentración de los Nitratos del medio MS a la Mitad.

³ MS Sales Inorgánicas del medio Murashige y Skoog (1982)

⁴ N₆ Sales inorgánicas de Chu *et al.*, 1975.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDUCCIÓN

ENSAYO 1

Efecto del aminoácido L-Prolina en la inducción de cultivo callogénico de STH de maíz (*Zea mays*, L. Raza Chalqueño)

Para probar sólo la cantidad de L. prolina se realizó un ensayo en STH. Se indujeron cultivos de callo a partir de tres medios distintos, C1, C2 y C5-0. Los cultivos se evaluaron cualitativamente a través de la presencia o ausencia de callo generado a partir de explantes de STH de plántulas. Dichas evaluaciones se llevaron al cabo de los 18 días después de la siembra. El número de repeticiones varió, el tratamiento C1 presentó seis repeticiones, el C2 ocho y el C5-0 diez.

ENSAYO 2

Efecto de la relación nitrato: amonio en la inducción de callo originado a partir de STH y EE.

El callo utilizado en este experimento se obtuvo a partir de STH así como del que se generó de EE. Todo el tejido callogénico presentó 18 días de inducción en el medio de cultivo correspondiente. Se limpió eliminando el tejido madre, y se pesaron 0.5 gr para cada repetición de cada medio, los cuales se cultivaron durante 7 días registrándose su peso final.

Los explantes originados de STH fueron sembrados en los medios C3, C4 y C5-0; mientras que los explantes EE exclusivamente en C5-0 (Cuadro 1).

PROLIFERACIÓN Y MANTENIMIENTO

Los callos fueron subcultivados cada 15 días en el mismo medio, exceptuando los producidos de STH que fueron subcultivados semanalmente, o cuando lo requerían.

ENSAYO 3

Evaluación de la etapa proliferativa en dos fórmulas de sales minerales en la proliferación de callo producido a partir de STH.

Se evaluó la etapa proliferativa en el tejido calogénico originado a partir de STH obtenido en el ensayo anterior; en el medio de cultivo C5, y fue utilizado como testigo ya que se ha utilizado con anterioridad en este laboratorio (Méndez, 1998).

ETAPA III ESTABLECIMIENTO Y EVALUACIÓN DE CULTIVOS DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN

INICIACIÓN Y MANTENIMIENTO

ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS EN SUSPENSIÓN

Los medios de cultivo utilizados en esta etapa se identifican con la letra S de suspensión, siendo el número un indicador de la composición; algunos mantienen su composición tal como fueron utilizados en la etapa de cultivo de callos por lo que se pone el mismo número sólo que cambiaron por no tener agente solidificante, otros cambiaron en sus niveles hormonales, por lo que cambia también el número.

Los cultivos madre de células en suspensión se establecieron mediante la inoculación de 2 g de callo disgregable en 30 ml de medio en matraces de 125 ml (cultivo madre). El tejido madre se eliminó por filtración después de 8 días. Los subcultivos se efectuaron cada 4 días, inoculando los matraces con una densidad de 0.2 ó 0.4 g de peso fresco (PF) en 15 ml de medio.

Los parámetros evaluados en los diversos ensayos fueron: peso fresco (PF), peso seco (PS) y contenido de proteínas totales, según el caso (Anexo II), con repeticiones que varían en número.

CONDICIONES DE CULTIVO

Todos los cultivos en suspensión se mantuvieron en agitación constante de 100 r.p.m. bajo condiciones de oscuridad y a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS EN SUSPENSIONES.

Los medios de cultivo utilizados en inducción y proliferación de cultivos de células en suspensión se muestran en el Cuadro 2. Ambos medios estuvieron suplementados con vitaminas y aminoácidos (Anexo 1) así como $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de caseína hidrolizada, $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de sacarosa y 20 mM de L-Prolina, probándose varias concentraciones de BAP. Se utilizó $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de 2,4-D para la inducción y $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ para la proliferación.

Cuadro 2.- Constitución de los medios de cultivo probados para la inducción y proliferación de cultivos de células en suspensión.

SALES	MEDIOS DE CULTIVO					
	S5	S6	S7	S8	S9	S10
N ₆	+		+	+		+
R ₂		+				
BAP (mg · L ⁻¹)	0.2	0.2	0	0.01	0.1	1

ENSAYO 4

Selección del medio de cultivo y tipo de explante para la obtención de cultivos en suspensión con mejores tasas de crecimiento.

Se establecieron y compararon cultivos en suspensión originados de callo producido a partir de tres explantes (EE, EC y STH) de maíz de la raza Chalqueño, sembrados en medios S5 y S6. Se evaluó peso fresco (PF), con tres repeticiones por muestra.

ENSAYO 5

Selección de la concentración óptima de Bencil amino purina (BAP) para cultivos en suspensión de segmentos de tallo y hoja (STH).

Las suspensiones de células se establecieron a partir de callo producido de STH de maíz probándose cinco concentraciones de BAP (Medio S7, S8, S9, S5 y S10 con 0, 0.01, 0.1, 0.2 y 1 mg · L⁻¹ de BAP) (Cuadro 2). Se evaluó el peso fresco (PF), con tres repeticiones por muestra.

ENSAYO 6

Selección de la concentración óptima de la auxina 2,4 - D para cultivos en suspensión de segmentos de tallo y hoja (STH).

Se establecieron y compararon cultivos en suspensión originados de callo producido a partir de STH en tres concentraciones de la auxina 2,4-D, 3, 4.5 y 6 mg · L⁻¹, dichos tratamientos son S5, S11 y S12 (Cuadro 3). En esta etapa se compararon diversos parámetros de crecimiento como son peso fresco y peso seco (Anexo II). Los parámetros evaluados en este ensayo fueron: peso fresco (PF) y peso seco (PS) con tres repeticiones para cada medio, y se analizaron curvas correspondientes a la tasa peso fresco/peso seco (PF/PS).

Cuadro 3.- Constitución de los medios de cultivo probados en etapa proliferativa de cultivos de células en suspensión con diferentes niveles de auxina.

Fitoreguladores	MEDIOS DE CULTIVO		
	S5	S11	S12
2,4-D mg L ⁻¹	3.0	4.5	6.0

ENSAYO 7

Evaluación del crecimiento de células en suspensión de maíz a través de la incorporación de timidina tritiada.

El objetivo de este ensayo es observar si existe síntesis de ADN dentro de nuestra población celular, proceso importante que señala la fase S del ciclo celular, y que indicará que nuestra población se encuentra en división o proliferación. Esto se evaluó mediante la técnica de incorporación de Timidina tritiada (Metil- ^3H) ($3 \mu\text{Ci ml}^{-1}$) al ADN celular (Aheme, 1977; Tochiyuki Nagata, 1993 tomado de Omrod y Francis, 1993). El nucleósido timidina presenta la función exclusiva de ser bloque en la construcción del ADN, de ser convertido rápidamente a nucleótido para su posterior incorporación en el ADN, así como del hecho que la célula vegetal no presenta barrera hacia la entrada de dicho nucleósido.

Se evaluó la incorporación de Timidina tritiada ($3 \mu\text{Ci ml}^{-1}$) al DNA celular, así como su posterior inhibición mediante la adición del bloqueador de la incorporación, la afidicolina. Se utilizaron altas concentraciones celulares en los cultivos (25×10^3 células por mililitro). Asimismo, se evaluó la curva correspondiente al parámetro de crecimiento contenido de proteínas.

La finalidad de adicionar el inhibidor afidicolina, compuesto antibiótico diterpenoide tetracíclico obtenido a partir del hongo *Cephalosporium aphidicola*, fue de corroborar que la incorporación del nucleósido tritiado se estuviera adicionando a la cadena nucleotídica, ya que este compuesto permite el bloqueo del ciclo celular de las células vegetales (Sala *et al.*, 1982; Spadari *et al.*, 1982) en la intersección de las fases G1-S sin desbalancear otros aspectos del metabolismo celular lo que daría como resultado un abatimiento de dicha incorporación.

Dicho compuesto inhibe a las ADN polimerasas tipo B (Wright y Brown, 1990 tomado de Campbel, 1991), nucleares replicativas (polimerasas α y δ de levaduras y animales, polimerasas virales y una polimerasa parecida a la α en plantas (Lui *et al.*, 1983); no afecta a las ADN polimerasas no replicativas de eucariotes, mitocondrias y síntesis de ADN plásmico, (polimerasas tipo β ó γ); ni a las ADN polimerasas de bacterias y bacteriófagos de *B. subtilis* y otros fagos (Spadari *et al.*, 1982).

El mecanismo de acción de la afidicolina es similar al utilizado por la arihidrazinopiridinas y butilfenilpurinas (Sheaff *et al.*, 1991 tomado de Campbel, 1991). Las moléculas inhibitoras se unen simultáneamente al sitio de unión de dNTP de su enzima blanco y a un apropiado residuo del templado primer, creando un complejo ternario análogo.

Este compuesto es un fuerte competidor de la incorporación de dCMP, menos de dTMP y muestra poca ó ninguna competencia con dAMP y dGMP (Chang *et al.*, 1981). Según Sheaff *et al.*, (1991) compete con cada uno de los cuatro dNTPs, pero es más potente cuando compete con dCTP. Las bases moleculares de la capacidad de la afidicolina para mimetizar dCTP no han sido establecidas.

Este experimento consistió de cuatro tratamientos (Cuadro 4); el tratamiento T1 fue el testigo de incorporación; a los tratamientos T3 y T4 se les adicionó el inhibidor Afidicolina pero a diferente tiempo, al primero (T3) al tiempo 0 y al T4 36 horas después. Ya que la afidicolina es disuelta en DMSO, se adicionó un control el cual corroborara que dicha sustancia no afecta el crecimiento del cultivo (tratamiento T2).

Así mismo, paralelamente a la evaluación de la incorporación de la timidina, se tomó 200µl de muestra para determinar contenido de proteínas.

Los matracas fueron inoculados con 25×10^3 células por mililitro de células en suspensión de STH de maíz y se les incorporó 3 µCi/ml de Timidina. Las muestras fueron tomadas a intervalos de 6 ó 12 horas y por duplicado.

Cuadro 4. Tratamientos utilizados en la sección de incorporación de Timidina tritiada en cultivos de células en suspensión.

	Tratamientos			
	T1	T2	T3	T4
Medio de cultivo				
Inóculo de 2.5×10^3 células				
Timidina (3 µCi)				
DMSO				
Adición del inhibidor			0	36 horas
Afidicolina al tiempo:				

Este ensayo se realizó siguiendo los pasos que a continuación se describen.

INCORPORACIÓN DE TIMIDINA (METIL-³H): Se adicionó 3 µCi/ml de Timidina a matracas de cultivos en suspensión. Se tomaron muestras de 2 ml del cultivo a intervalos de 12 horas. Las muestras se centrifugaron a 4000 r.p.m., posteriormente se eliminó el sobrenadante y al paquete celular se le adicionó 1 ml de buffer Tris HCl, se agitó en un vórtex durante 10 segundos, o hasta

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

que el paquete celular se incorporara al buffer. Se repitieron estos dos últimos pasos dos veces más. Las muestras fueron homogeneizadas en un polítrón marca PCU-2 durante 3 minutos.

De cada muestra se tomó un alícuota de 200 μl del homogenado y se guardó en un tubo eppendorf a 2° C para la cuantificación de proteínas (Anexo II), proceso que se llevaría al cabo al concluir el muestreo.

Posteriormente se adicionó 2 ml de TCA al 10% y se colocó la muestra en hielo. Después las muestras se filtraron al vacío en filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C y se tomó lectura de la incorporación de cuentas por minuto en un contador de centelleo (Beckman IS6000IC) durante 1 minuto; las muestras se tomaron por duplicado.

INHIBICIÓN DE INCORPORACIÓN DE TIMIDINA: Se probó una concentración de afidicolina de 10 μM en cultivos de células en suspensiones originados a partir de STH en medio base S5 con 0.2 mg L^{-1} de BAP y 3 mg L^{-1} de 2,4-D.

Se probó la actividad de la afidicolina sobre la enzima polimerasa, obtenida de ejes embrionarios en germinación de maíz de la misma raza (Coello *et al.*, 1992).

La función inhibitoria de la afidicolina fue ensayada en 50 μl de la siguiente mezcla de reacción: 40 mM Tris-HCl a un pH 7.6, 16 mM KCl, 6 mM MgCl_2 , 0.1 mM de cada uno de los dNTPs, 4 % glicerol, 0.4 mM 2-Mercaptoetanol, 10 μgr de DNA activado de timo de ternera y 2.5 μl de la fracción II de polimerasa de maíz, y 5 μCi de (Metil- ^3H)TTP. La incubación se llevó a cabo durante 15 minutos a una temperatura de 37°C. La reacción fue detenida por adición de 1 ml de TCA al 10%. Estas muestras fueron colocadas en hielo durante 15 minutos. Posteriormente se se filtró y la incorporación se midió en un contador de centelleo.

V RESULTADOS

Y

DISCUSIÓN

ETAPA I ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO *IN VITRO*.

El método probado resultó eficiente en el presente trabajo, pues se obtuvo un 100 % de embriones y plántulas libres de patógenos.

ETAPA II INDUCCION, PROLIFERACIÓN Y MANTENIMIENTO DE CALLO.

ENSAYO 1

Efecto del aminoácido L-Prolina en la inducción de cultivo calogénico de STH de maíz (*Zea mays*, L. Raza Chalqueño)

Se evaluó a los 18 días la inducción de callo, a través del número de explantes con presencia o ausencia de callo generado a partir de STH de plántulas en los medios C1, C2 y C5-0 a los 18 días de cultivo como se mencionó en materiales y métodos. Cabe señalar que tanto el medio C1 como el C2 estuvieron constituidos por la misma formulación de sales minerales pero se diferenciaron por la presencia o ausencia de L- Prolina; el medio C5-0 tuvo una formulación diferente y una concentración mayor de prolina.

Los resultados obtenidos en este ensayo se exponen en la figura 7, en donde se observa que el medio C5-0 presentó un porcentaje mayor de explantes con callos; en el medio C1, el cual fue el único que no tuvo prolina, se advirtió una respuesta nula a la formación de callo.

A pesar de que los medios C1 y C2 presentan la misma formulación de sales minerales, es evidente que la presencia del aminoácido L-prolina es fundamental en la iniciación del callo ya que el medio que no lo tiene, no lo genera, produciendo oxidación en los explantes. Se ha encontrado que la L-prolina es esencial para el crecimiento de callo, por ejemplo en el cultivo de embriones inmaduros de la línea híbrida A188 (*Zea mays*, L.) (Amstrong y Green, 1985), y de anteras de trigo y callo de alfalfa (Sozinov *et al.*, 1981; Stuart y Stricland, 1984). Britikov *et al.*, (1970) señalan que la prolina es una fuente importante de nitrógeno en el metabolismo vegetal, mientras que Stewart *et al.*, (1966) mencionan que este aminoácido actúa como una fuente de energía.

Con respecto a los resultados obtenidos de los medios C2 y C5-0 se observa que el primero presenta un 15% menos explantes con callo. Es probable que esta respuesta sea debida a la concentración del aminoácido, sin embargo, no es posible concluir tal efecto ya que tanto la concentración de la L-prolina, como la formulación de sales minerales son diferentes.

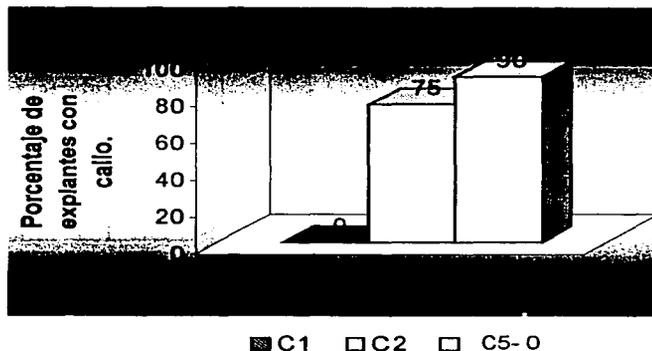


Figura 7.- Porcentaje de Explantes obtenidos a partir de STH obtenidos de plántulas de maíz (*Zea mays*, L., Raza Chalqueño) que fueron inducidos a formar callo en los medios de cultivo C1, C2 (sales minerales SH) y C5-0(Sales minerales N₀).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ENSAYO 2

Efecto de la relación nitrato: amonio en la inducción de callo originado a partir de STH y EE.

Debido a que en el ensayo anterior se determinó que es probable que los macro nutrientes participen en gran medida en el crecimiento del cultivo, en este experimento se buscó determinar la mejor relación de los iones principales como son el nitrato y el amonio ya que la cantidad relativa de ambos iones puede ser crítica para el crecimiento y morfogénesis de células vegetales (Reinert *et al*, 1967; White, 1943). Así mismo se probó un explante más, eje embrionario, con la finalidad de determinar si su respuesta era igual o mejor que los segmentos de plántulas, para lo cual se indujo callos a partir de STH en los medios C3, C4 y C5-0. Los EE se cultivaron en el medio C5-0 ya que en el experimento anterior resultó el mejor medio para STH.

Se evaluó la respuesta a través del peso fresco de callo acumulado en 7 días de un subcultivo, después de un subcultivo; también se calcularon algunos parámetros de crecimiento.

En la figura 8 se observa que el medio C5-0 favoreció la formación de callo procedente del explante STH (incremento superior a 13 veces el peso inicial) (Lámina 1), sin embargo, en EE (Lámina 2), en el mismo medio, produjo un menor crecimiento dado que presentó un incremento de 4.97 g en siete días lo que representa un aumento mayor a 9.94 veces. En los medios C3 y C4, el callo obtenido del explante STH, presentó un incremento de 5.4 y 5.7 respectivamente (incremento superior a 10 veces).

La evaluación de la eficiencia del crecimiento del cultivo se calculó mediante análisis de los parámetros TRC, TD y ND (Cuadro 3 y Anexo IV). Los cultivos crecidos en el medio C5-0

demuestran una TRC de 0.32, asimismo se observa que en 2.18 días triplica su peso inicial, mientras que los medios C3 y C4 no logran triplicar su peso en el mismo tiempo; en el medio C4 sí lo triplica pero en un mayor tiempo.

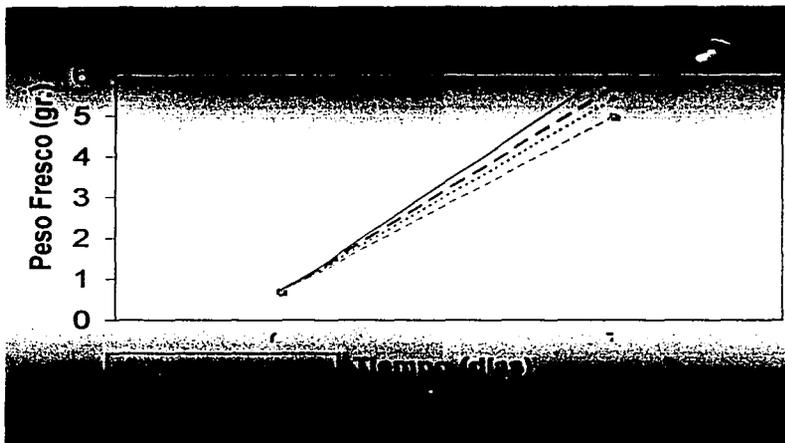


Figura 8.- Peso fresco obtenido de callos de maíz (*Zea mays*, L. Raza Chalqueño) originados a partir de STH y EE crecidos en distintos medios de cultivo.

El medio C5-0 favoreció la formación de callo en el explante procedente de STH, sin embargo, el mismo medio con el explante EE dió un incremento menor.

Esto probablemente fue debido a la zona de la cual se obtuvo el callo que fue distinta; por ejemplo, en EE, el callo se originó de la zona donde fue eliminado el cotiledón único. El explante eje embrionario es el que presenta el menor crecimiento, en éste explante, la cantidad de tejido meristemático presente es muy poco, lo que limita la inducción de callo, además,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

el metabolismo celular se encuentra detenido o es muy bajo. Esto no ocurre en el explante STH, ya que los meristemas intercalares se encuentran en plena división, además de encontrarse en mayor cantidad por individuo.

Cuadro 3.- Tabla comparativa de TRC, TD y ND correspondientes al crecimiento de callo de EE En tratamientos C5-0 y STH en los medios C3, C4 y C5-0.

Explan- te	EE		STH	
	C5-0	C3	C4	C5-0
TRC	0.28	0.29	0.299	0.32
TD	2.475	2.38	2.318	2.1817
ND	2.88	2.957	3.024	3.13

Aún cuando estos resultados son sutilmente similares, se puede observar que la tendencia a un mayor crecimiento se alcanza en mayor proporción en el medio C5-0.

Es importante resaltar que para establecer células en suspensión se busca obtener mayor cantidad de callo en menor tiempo, así como la cantidad de materia prima inicial. Para la obtención de callo de EE requerimos alrededor de 16 – 20 ejes embrionarios para la obtención de la misma cantidad de callo, sin embargo, en STH la zona meristemática tiene una superficie de 1 cm² y da una mayor cantidad de callo por plántula.

Pero partiendo de la misma cantidad de callo, los incrementos entre los distintos medios son muy similares, lo que indicaría que el disparo en el incremento de peso fresco podría ser debido a dos factores, la cantidad de fitoregulador 2,4-D y a las distintas formulaciones de sales minerales.

Si se compara el comportamiento de los callos en los medios C3 y C4, su comportamiento es muy similar, lo cual se explica en el hecho de que la relación $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ es igual en ambos

medios, de aproximadamente 1:2. Sin embargo, cambia en la cantidad de dichos iones, esto se puede advertir en el anexo III, en donde se observa que aún cuando es la mitad de la cantidad de nitratos y amonio en el medio C3, la relación no varía. En cuanto al medio C5-0 la relación es diferente ya que es 1:4 ($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$), siendo las cantidades de NH_4^+ menores a los otros dos medios y mayor de NO_3^- en comparación al medio C3.

Estadísticamente, no hubo diferencias significativas entre medios y entre explantes, ya que todos los medios indujeron una buena proliferación de callo a los 7 días ($F= 4.22$; $G.L.=3.20$; $P<0.01$. $Ft=4.43$; $G.L.=3.20$; $P<0.01$) (Figura 8).

A pesar de que las proporciones de nitrato: amonio varían de 1:2 en C3 (R2) y C4(MS) y de 1:4 en C5-0(N₆), los incrementos entre los distintos medios son muy similares, lo cual indicaría que el crecimiento o división celular es debido a otro factor y no en sí al tipo de explante o fórmula nutritiva. El factor importante es la alta concentración del regulador vegetal, ya que se utiliza en concentración elevada, para dar el disparo hacia la desdiferenciación del explante.

Sin embargo, se observa una tendencia en la cual el medio C5-0 para STH produce una mayor cantidad de callo.

ENSAYO 3

Evaluación de la etapa proliferativa en dos fórmulas de sales minerales en la proliferación de callo producido a partir de STH.

Se cuantificó la etapa proliferativa del cultivo de callo (Lámina 3), mediante los parámetros de crecimiento obtenidos a partir del peso fresco, así como del análisis estadístico correspondiente.

El análisis estadístico mostró que, los medios de cultivo no ejercen un efecto significativo en el crecimiento de callo originado de STH ($F=0.9055$; $G.L.=1.8$; $P<0.05$), situación contradictoria a la etapa de inducción.

Este experimento en realidad es la continuación del anterior, pero se decidió omitir el medio C4, al presentar una respuesta muy similar al C3; se podía prescindir de él ya que resultaría un gasto innecesario.

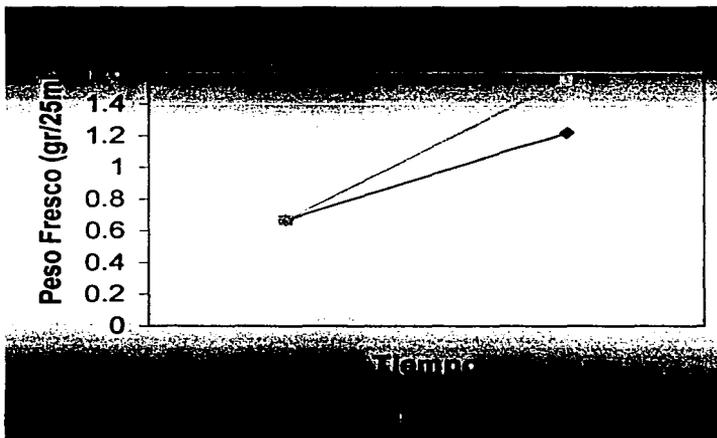


Figura 9.- Peso fresco obtenido de callos en proliferación de maíz (*Zea mays*, L., raza Chalqueño) originados a partir de STH crecidos en medio C5 y C6, con 4 y 5 repeticiones respectivamente.

Los parámetros de eficiencia del crecimiento del cultivo de callo correspondientes al medio C5 fueron, una TRC de $0.12 \text{ g} \cdot \text{día}^{-1}$, y un TD de 5.9 días así como un ND de 1.18 veces su peso inicial, mientras que el C6 presentó una TRC de $0.079 \text{ mg} \cdot \text{día}^{-1}$, y un TD de 8.7 y ND de 0.80.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La evaluación se realizó de igual forma que el experimento anterior, encontrándose como se observa en la figura 9 que los cultivos de callo del medio C5 crecieron más que los de los medios C6. Esta tendencia fue exactamente igual que la del experimento anterior.

Cabe señalar que en la etapa de proliferación se disminuyó la concentración de 2,4-D a la mitad, pero todos los demás componentes del medio se mantuvieron estables. En esta etapa la ganancia en peso fresco no fue tan grande como en la etapa de inducción puesto que la concentración de la auxina fue reducida a $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de 2,4-D, lo que implicaría que la respuesta del cultivo es probable que sea debida a la concentración de auxina.

FASE III ESTABLECIMIENTO Y EVALUACION DE CULTIVOS DE CELULAS EN SUSPENSION

ENSAYO 4

Selección del medio de cultivo y tipo de callo para la obtención de cultivos en suspensión con mejores tasas de crecimiento.

Se adicionó un nuevo explante ya que surgió la interrogante de si en el EC (embrión completo), el cotiledón de alguna manera podría influir positivamente en el aumento de la proliferación celular.

Mediante tratamiento estadístico (Manova tipo III) se encontró un valor de significancia de cero para los explantes con una F igual a 13.377, lo que indica que no hubo diferencias entre explantes. El valor de significancia para los medios de cultivo fue de 0.7497 y con una F de 0.106, mientras que en el tiempo, el valor de significancia fue de 0.1268 y la F de 1.915.

A pesar de que se detectaron pocas diferencias, se pudo observar una tendencia. Para identificar mejor esta inclinación se utilizaron los cuadrados medios obtenidos de la Manova Tipo III. En primera instancia, estos resultados indican que ambos medios de cultivo (N_2 y R_2) son iguales para un mismo tipo de explante (valor igual a 25 en ambos medios) (Anexo III), sin embargo, en cuanto a las diferencias con respecto a los explantes, sugieren que el mejor fue el STH, el que le sigue es el EC y por último el EE, como se muestra en la Figura 10. Lo anterior tiene su explicación en el hecho de que las células provenientes del callo de STH presentaron una mayor proliferación, porque al generarse el callo de un tejido con zonas ampliamente meristemáticas, sus células derivadas conservan la característica de ser meristemáticas, por lo cual al establecer la suspensión, dichas células mantuvieron dicha condición.

Las zonas de las cuales se obtiene el callo son distintas para cada explante, en el caso de EE, el callo se originó de la zona donde fue eliminado el cotiledón único. Se observa que en efecto, el explante que promovió menor cantidad de callo, fue el eje embrionario, este tejido presenta un estado quiescente, en donde el metabolismo celular se encuentra detenido o es muy bajo. La no-existencia del escutelo probablemente baje su rendimiento y su crecimiento y producción del callo, ya que el cotiledón único en monocotiledóneas (las Gramíneas) es altamente especializado para la absorción de nutrientes y hormonas vegetales (Bewley y Black., 1994).

En el embrión maduro completo (EC) el cotiledón es un órgano de reserva, lo que ayuda a que el crecimiento sea más eficiente (Bewley y Black., 1994). En el EC, se presentó la germinación propiamente dicha; el callo se originó de la misma zona, pero se presentó en mayor cantidad, ya

que el escutelo transloca reservas y sintetizan auxinas *de novo* (Bewley y Black., 1994) (Lámina3).

Por otro lado, los segmentos de tallo y hoja se encuentran en plena división. El tejido meristemático se encuentra en mayor cantidad, ya que este tipo de explante contiene varios tipos de zonas meristemáticas, en el tallo se observan el meristemo apical y el meristemo del cuerpo del tallo o del engrosamiento primario periférico; en los fitómeros se encuentran zonas meristemáticas en los márgenes así como zonas meristemáticas para el alargamiento del mismo (Essau, 1976), y sus tejidos están en división continua, lo cual indica que la concentración de reguladores de crecimiento vegetal como AIA, Zeatina y Cinetina, así como del metabolismo en el que se encuentra, es distinto en las distintas estructuras o explantes comparados (Lámina 5 y 6).

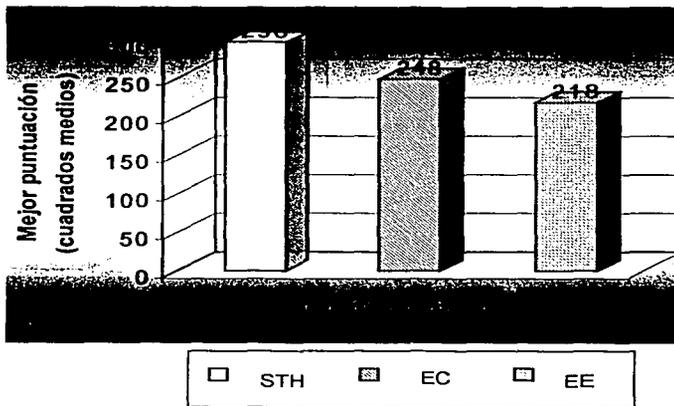


Figura 10.- Comparación de mejor explante de callos de maíz de la raza Chalqueño. Estos resultados se obtuvieron a partir de los Cuadrados medios del tratamiento estadístico MANOVA tipo III.

Tanto el eje embrionario, como el EC al momento de obtener el callo se encuentran en estado germinativo, que incluye numerosos eventos, tales como hidratación de proteínas cambios estructurales subcelulares, respiración, síntesis macromolecular, y elongación celular. Las zonas meristemáticas, tanto de EE como de EC comienzan a despertar, mientras que en el STH, dichas zonas de la plántula se encuentran en crecimiento pleno (Bewley y Black., 1994).

En la Figura 11 se observa un resumen de los resultados obtenidos del tratamiento estadístico Manova tipo III. Se observa que el mejor explante es el STH, en el medio S5; mientras que los explantes EC y EE prefieren S6.

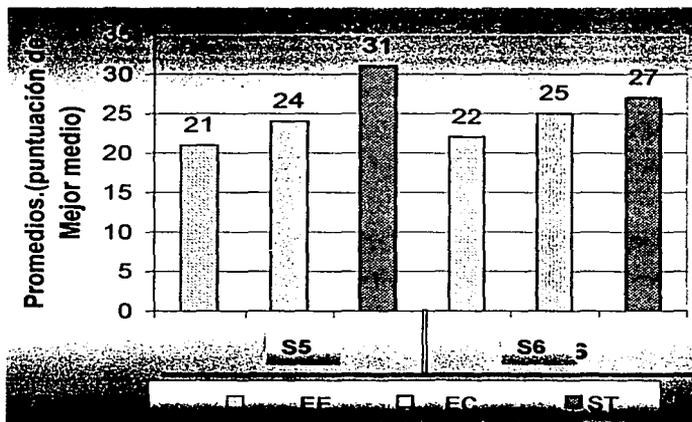


Figura 11. Comparación de puntuación de mejor medios de cultivos en suspensión obtenidos de callos de maíz de la raza Chalqueño originados a partir de tres tipos de explante (STH, EC y EE) en los medios (S5 y S6). Esos resultados se obtuvieron a partir de los cuadrados medios del tratamiento estadístico MANOVA tipo III.

En la Figura 12 se observa la cinética de crecimiento de las células, notándose que a las 24 horas, las células provenientes de STH logran mayor peso fresco en el medio N₆ (S5) en comparación con las crecidas en el medio R2 (S6). Sin embargo, ocurre lo contrario con el explante EC, este prefiere el medio R2 y el N6 no le favoreció. El explante EE en ambos medios presentan nulo crecimiento, no se recuperan.

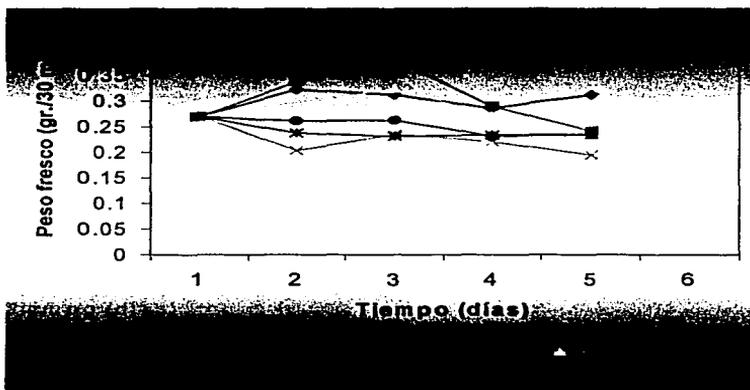


Figura 12.- Gráfica comparativa de Peso fresco vs intervalos de tiempo de diferentes explantes y así como diferentes medios.

A continuación se presentan los cuadros correspondientes a las Tasas Relativas de Crecimiento (TRC), Tasa de Duplicación (TD) y Número de Duplicaciones (ND) correspondientes a los distintos tratamientos. El mejor tratamiento corresponde al tratamiento STH S5, el cual presenta la mayor TRC en el mismo tiempo, así como el mayor número de duplicaciones (0.8) y la mayor TD (Cuadro 4).

El tratamiento que le sigue es STH en S6, posteriormente le sigue el EC en S6 y S5, y por último EE en S6 y S5 respectivamente.

Cuadro 4.- Parámetros de crecimiento celular (TRC, TD y ND) de los dos tratamientos (S5 y S6) para los tres tipos explantes (STH, Segmentos de Tallo y Hoja; EC, Embrión con Escutelo; EE, Eje embrionario) de cultivos en suspensión de *Zea mays* L. Raza Chalqueño.

Intervalo De Tiempo **TASAS RELATIVAS DE CRECIMIENTO**
Explante y medio

	STH S6	STH S5	EC S6	EE S5	EE S6	EC S5
T2-T1	0.179	0.225	0.097	-0.280	-0.126	-0.033
T3-T2	-0.031	0.120	0.087	0.144	-0.028	0.006
T4-T3	-0.090	-0.273	-0.175	-0.066	0.011	-0.127
T5-T4	0.090	-0.181	-0.154	-0.125	0.006	0.012

TASAS DE DUPLICACIÓN
Explante y medio

	STH S6	STH S5	EC S6	EE S5	EE S6	EC S5
T2-T1	0	3.08581	7.14642	-2.4729	-5.49457	-20.838
T3-T2	-22.0403	5.78812	7.97901	4.82724	-24.3848	121.08
T4-T3	-7.68359	-2.53976	-3.96885	-10.532	60.4005	-5.4568
T5-T4	7.683589	-3.83074	-4.48765	-5.5246	122.298	56.934

Intervalo De Tiempo **NÚMERO DE DUPLICACIÓN**
Explante y medio

	STH S6	STH S5	EC S6	EE S5	EE S6	EC S5
T2-T1	0.758866	0.80426	0.67663	0.29933	0.45348	0.5464
T3-T2	0.468842	0.59995	0.62357	0.84731	0.60706	0.6001
T4-T3	0.424002	0.15426	0.32359	0.57434	0.65954	0.4648
T5-T4	0.644361	0.36706	0.4211	0.5438	0.64865	0.6602

ENSAYO 5

Selección de la concentración óptima de Bencil amino purina (BAP) para cultivos en suspensión de segmentos de tallo y hoja (STH).

El objetivo de este ensayo fue el obtener la concentración óptima de BAP para cultivos en suspensión originados de callo producido a partir de STH de *Zea mays*, L. Raza Chalqueño. En esta etapa se compararon diversos parámetros de crecimiento, así como análisis estadístico.

Se encontró que todos los tratamientos presentan una TRC en aumento (Cuadro 5) a la par que incrementa la concentración de BAP ($S7 < S8 < S9 < S5$). La excepción es el tratamiento S10, que se comporta de manera inversa, pues presenta la mayor concentración de BAP y la menor TRC.

El tratamiento S5 es el mejor, ya que presenta un TD menor y un ND mayor. A pesar de que el medio S7 no contiene la citocinina BAP, presenta una ND de casi 1 y un TD un poco superior a las 72 horas, lo que implicaría que el cultivo permanece en división aún en la ausencia de BAP. Esto podría deberse a la presencia de adenina en el medio, o a la existencia en las células de citocininas naturales que dan lugar a la división celular.

Desde el punto de vista estadístico, la concentración de BAP no afecta significativamente el crecimiento del cultivo, ($F=1.910; G.L.=5.24; P<0.05$, se excluyen 5 valores), esto es que entre los tratamientos, el comportamiento de las curvas es muy semejante.

Cuadro 5. Parámetros de cuantificación (TRC, TD y ND) de cultivos en suspensión de células de maíz de la raza Chalqueño en cinco concentraciones de BAP.

Parámetros De Crecimiento	MEIOS DE CULTIVO (CONCENTRACIÓN DE BAP)				
	S7 0 mg · L ⁻¹	S8 0.01 mg · L ⁻¹	S9 0.10 mg · L ⁻¹	S5 0.20 mg · L ⁻¹	S10 1 mg · L ⁻¹
TRC	0.560	0.642	0.734	1.464	0.405
TD	1.239	1.080	0.944	0.473	1.710
ND	1.498	1.580	1.673	2.403	1.344

La cinética de crecimiento de las células originadas a partir de callo producido de STH de plántulas de maíz (*Zea mays*, L., raza Chalqueño), cultivadas en los cinco medios (tratamientos S7, S8, S9, S5 y S10 presentaron 0.0, 0.01, 0.10, 0.20 y 1 mg · L⁻¹ respectivamente), están representadas en la figura 13.

El crecimiento del cultivo se presenta, aún en ausencia de la citocinina (tratamiento B1); esta gráfica presenta un comportamiento sigmoidal, dicha curva presenta una fase lag de casi 24 horas, una linear de 24 a 72 dónde alcanza su punto máximo, a partir del cual declina.

El tratamiento S8 modifica el crecimiento del cultivo, exhibe un comportamiento oscilatorio, pero con una tendencia ascendente; se observan dos curvas de crecimiento, una que muestra su punto máximo a las 24 horas y la otra a las 72 horas. En cuanto a las fases de crecimiento de la

curva correspondiente, se encuentran la fase lineal (1-24 y 48 - 72 horas) y la fase de desaceleración (24-48 y 72 - 96 horas). Entre las 24 y las 48 podría definirse una fase estacionaria, y una segunda lineal, pero no se puede estar seguro, a causa de que las desviaciones son demasiado amplias y no podríamos delimitar con certeza el comportamiento real de dicha curva.

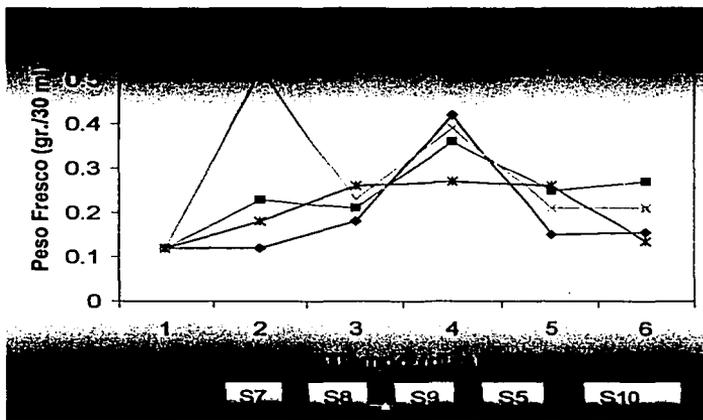


Figura 13.- La cinética de crecimiento de las células originadas a partir de callo producido de STH de plántulas de maíz (*Zea mays*, L., raza Chalqueño), cultivadas en los cinco medios (tratamientos S7, S8, S9, S5 y S10 presentaron 0.0, 0.01, 0.10, 0.20 y 1 mg L⁻¹ respectivamente).

La curva S9 no presenta una fase lag, pero existe una fase lineal de las 0 a las 24 horas; también se observan dos puntos máximos; uno a las 24 horas, el cual se mantiene durante las siguientes 24 horas (de las 24 a las 48 horas) (fase estacionaria), y el segundo, el cual se presenta a las 96 horas. Dicho punto presenta un incremento del 72 %. A partir de éste último punto, se presenta una fase de desaceleración y mortalidad celular.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El tratamiento S5 presenta un comportamiento ascendente oscilatorio y está formado por dos ciclos de crecimiento. El pico máximo se presenta a las 24 horas y supera a todos los tratamientos. El segundo pico, correspondiente a las 72 horas y es casi de la misma magnitud que el máximo encontrado en el tratamiento S9. Las fases de crecimiento observadas en esta curva son: dos fases lineal, una en el intervalo 0-24 horas y la otra de las 48 a las 72 horas, así como dos fases de mortalidad, (24-48 y 72- 96 horas), y una fase lag a partir de las 96 a las 120 horas.

El medio S10 produce una curva de menor crecimiento que todas las curvas de menores concentraciones de la citocinina. Esta curva presenta una fase lineal de las 0 a las 24 horas, a partir de esta hora y hasta las 96 horas, se observa una fase estacionaria, a partir de la cual comienza la fase de desaceleración. Es probable que el efecto producido por esta concentración sea inhibitorio en el crecimiento del cultivo.

Las citocininas incrementan la tasa de división celular y decrecen el rango de plodías en células en suspensión pues estimulan la división celular de células meristemáticas (Kibbert y Newmann, 1980). Por otro lado, Oono (1982) (tomado de Fujiwara, 1982) reportó que un alto nivel de benziladenina (30 mg. L⁻¹) incrementa considerablemente la variabilidad genética de cultivo de callo de arroz comparado a aquel encontrado con 2 mg · L⁻¹.

La adición de la base adenina probablemente fue lo que dio lugar a la proliferación celular. La biosíntesis de las citocininas se da gracias a modificaciones de la base adenina (McGaw, 1995; Salisbury y Ross, 1992). Skoog y Tsui (1948) y Miller y Skoog (1953) (tomados de George y Sherrington, 1984) descubrieron que la adenina puede inducir formación de yemas en segmentos de tallo de tabaco, así como callo *in vitro*. Después del subsecuente descubrimiento de que la citocinina estructuralmente está relacionada a una base púrica, la adenina es utilizada en muchos tipos diferentes de cultivo llevando a la regeneración de la planta. Con respecto a

este experimento, se debió de tomar un testigo al cual no se le pusiera dicha base adenina, para corroborar que el crecimiento se debe a la adición de dicha base o al contenido de citoquinas propio de las células.

ENSAYO 6

Selección de la concentración óptima de la auxina 2,4 - D para cultivos en suspensión de segmentos de tallo y hoja (STH).

El objetivo de este ensayo fue el obtener la concentración óptima de 2,4-D para cultivos en suspensión originados de callo producido a partir de STH de *Zea mays*, L. Raza Chalqueño (Lámina 7), para lo cual se probaron tres concentraciones de la auxina 2,4-D, 3, 4.5 y 8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ en el medio base N_6 , dichos tratamientos son S5, S11 y S12 respectivamente. En esta etapa se compararon diversos parámetros de crecimiento como son peso fresco y peso seco, asimismo se analizaron curvas correspondientes a la tasa peso fresco/peso seco (PF/PS).

El valor de la tasa peso fresco/peso seco (PF/PS) es utilizado como un índice del contenido de líquido intracelular; el incremento de líquido en las células conlleva a incrementar el valor del peso fresco (In-Suk y Dung-II, 1993).

Los resultados obtenidos del tratamiento S5 (3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de 2,4-D) se muestran en la Figura 14 donde se observan los tres parámetros de crecimiento (peso fresco, peso seco y contenido de proteínas). Dichas curvas presentan tendencias similares, a diferencia de los otros dos tratamientos S11 y S12 que presentan concentraciones de 4.5 y 8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de 2,4-D respectivamente, cuyos patrones varían considerablemente (Figuras 15 y 16).

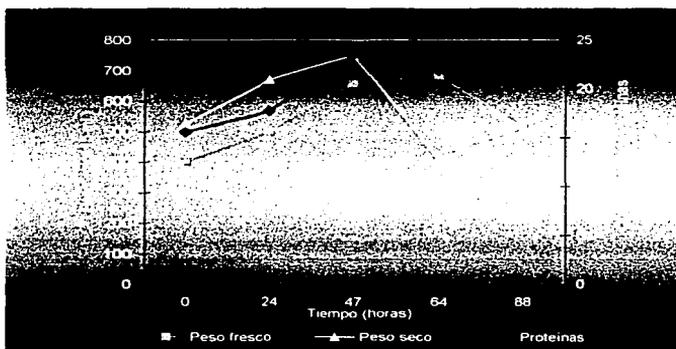


Figura 14. Curvas comparativas de Peso Fresco, Seco y contenido de proteínas totales para cultivos en suspensión de células de *Zea mays*, L. raza Chalqueño, cultivadas en medio S5 con una concentración de 2,4-D de 3 mg L^{-1} .

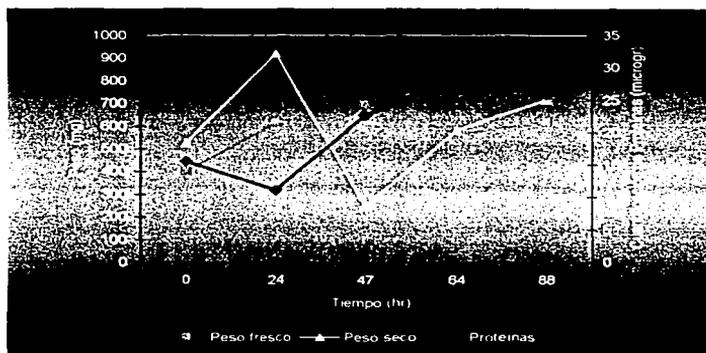


Figura 15. Curvas comparativas de Peso Fresco, Seco y contenido de proteínas totales para cultivos en suspensión de STH de células de *Zea mays*, raza Chalqueño, cultivadas en medio S11 con una concentración de 2,4-D de 4.5 mg L^{-1} .

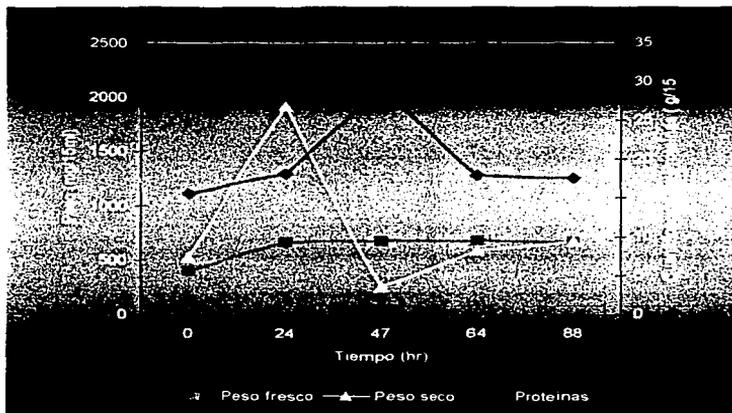


Figura 16. Curvas comparativas de Peso Fresco, Seco y contenido de proteínas totales para cultivos en suspensión de células de STH de maíz (*Zea mays*, L. raza Chalqueño), cultivadas en medio S12 con una concentración de $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de 2,4-D.

Battat *et al.*, 1989 (tomado de In-Suk Park and K. Dong-II, 1993) encontraron que el valor de la tasa PF/PS permanece constante a través de la fase exponencial e incrementa sólo cuando el azúcar se agota en medio de cultivo, lo que indica que el peso fresco es mayor al peso seco, esto se puede observar en la Figura 17 en la curva correspondiente al tratamiento S5 donde se observa que esta se mantiene con valores mínimos hasta las 36 horas y a partir de este momento comienza a incrementar hasta las 64 horas, a partir de las cuales disminuye.

La población celular de nuestros cultivos es muy heterogénea, probablemente se encuentre constituida de cohortes celulares que están en diferente fase del ciclo celular, que responden de manera diferente a las tres concentraciones de 2,4-D. Las concentraciones de 4.5 y $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ conllevan a las células a división celular en corto tiempo, lo que podemos observar en la figura 17, curvas S11 y S12, donde se observa que existe un incremento máximo en peso seco, que se

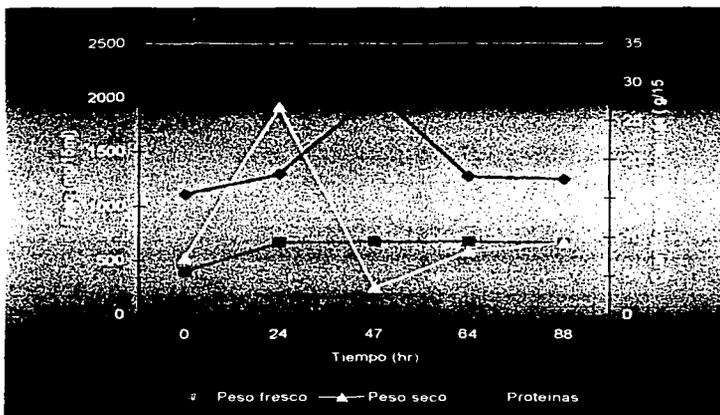


Figura 16. Curvas comparativas de Peso Fresco, Seco y contenido de proteínas totales para cultivos en suspensión de células de STH de maíz (*Zea mays*, L. raza Chalqueño), cultivadas en medio S12 con una concentración de $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de 2,4-D.

Battat *et al.*, 1989 (tomado de In-Suk Park and K. Dong-II, 1993) encontraron que el valor de la tasa PF/PS permanece constante a través de la fase exponencial e incrementa sólo cuando el azúcar se agota en medio de cultivo, lo que indica que el peso fresco es mayor al peso seco, esto se puede observar en la Figura 17 en la curva correspondiente al tratamiento S5 donde se observa que esta se mantiene con valores mínimos hasta las 36 horas y a partir de este momento comienza a incrementar hasta las 64 horas, a partir de las cuales disminuye.

La población celular de nuestros cultivos es muy heterogénea, probablemente se encuentre constituida de cohortes celulares que están en diferente fase del ciclo celular, que responden de manera diferente a las tres concentraciones de 2,4-D. Las concentraciones de 4.5 y $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ conllevan a las células a división celular en corto tiempo, lo que podemos observar en la figura 17, curvas S11 y S12, donde se observa que existe un incremento máximo en peso seco, que se

manifiesta en el punto mínimo de la a las 24 horas en ambas curvas. Este valor es proporcional a la concentración del fitoregulador.

El efecto que produce la concentración de 2,4-D de 3 mg L^{-1} dispara una población de células hacia mitosis, pero no así a toda la población que se encuentra en G_0 , por lo cual el incremento es relativamente bajo.

Por otro lado las curvas S11 y S12 comienzan a incrementar el peso fresco a partir de las 24 horas, valores máximos de la razón PF/PS, mientras que la curva S5 a partir de las 47 horas. Esto indica que probablemente el incremento en peso fresco sea debido a la entrada de líquido, producida por la acidificación de la pared celular que provoca la entrada del ión Potasio a la célula; este hecho contrarresta la salida de iones de hidrógeno (protones) dando lugar al decremento del potencial hídrico que se manifiesta permitiendo la entrada de agua a la célula que se expande.

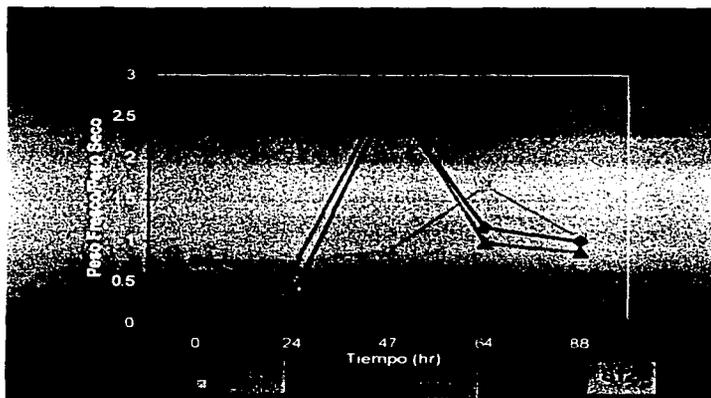


Figura 17 Gráfica comparativa de peso fresco/peso seco (PF/PS) para determinar la cantidad de contenido de agua en las células. Triángulos S11, Rombos es S12, y Cuadros S5.

ENSAYO 7

Evaluación del crecimiento de células en suspensión de maíz a través de la incorporación de timidina tritiada.

La función inhibitoria de la afidicolina fue llevada a cabo con el objetivo de valorar la efectividad de dicha sustancia sobre una enzima replicativa como es la ADN polimerasa 2, obtenida de ejes embrionarios en germinación de maíz de la misma raza (Coello *et al.*, 1992). Esta enzima es caracterizada como una fosfoenzima (Coello y Vázquez-Ramos, 1995a), con una procesividad de 12-22 nucleótidos por evento de unión (Coello y Vázquez-Ramos, 1995b) y con una masa molecular de 450 Kda holoenzima compuesta de 7 subunidades (90, 83, 70, 60, 55, 45 y 24 Kda), inmunoinhibida por anticuerpos contra ADN polimerasa α de timo de temera y se cree que es una enzima tipo α ,e inhibida por la afidicolina.

En la figura 18, las curva T1 y T2, presentan un incremento en la cantidad de marca radiactiva (C.P.M.) hasta llegar a un punto máximo a las 36 horas, tiempo en el cual ambas curvas decaen en la incorporación.

Con respecto al testigo del DMSO, tratamiento T2, este compuesto no inhibe el crecimiento del cultivo, al contrario, ayuda de alguna manera al mismo, ya que el incremento máximo en incorporación se da en esta curva.

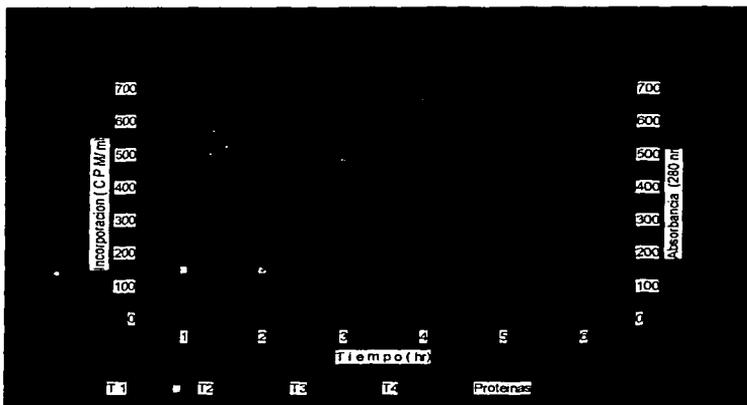


Figura 18 . Gráfica comparativa correspondiente a los tratamientos T1 (incorporación), T2 (DMSO), T3 (Aphy1) y T4 (Aphy2). En el tratamiento T3 se aplicó el inhibidor al tiempo 0, y en el T4 a las 36 horas.

Ambas curvas experimentales, T3 y T4, presentan una planicie a las 36 horas, lo que implica inhibición en la incorporación de la Timidina tritiada (Figura 18), tiempo en el cual fue adicionado el inhibidor Afidicolina. Sin embargo, en la curva T3 se esperaría que no existiera incorporación ya que la adición de la afidicolina fue al inicio del cultivo, lo que no ocurre (Figura 18).

En la figura 19 se observan las cuatro curvas correspondientes a los tratamientos T1, T2, T3 y T4. Cada curva presenta el promedio así como sus desviaciones estándar.

Las desviaciones estándar correspondientes a los cuatro tratamientos se pueden observar en la Figura 19. La curva del tratamiento T1 presenta unas desviaciones estándar muy variables. En

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

la curva T2 correspondiente al tratamiento DMSO, las desviaciones fueron pequeñas y casi de la misma proporción, excepto a las 60 horas.

En general, las curvas experimentales, tratamientos T3 y T4, presentan desviaciones estándar de moderadas a pequeñas.

Las curvas T2 y T3 presentaron desviaciones grandes a las 60 y 48 horas respectivamente. Ya que la población celular de estos cultivos es heterogénea en su composición, es probable que alguna fracción de la población comenzó a entrar en la fase S del ciclo celular, lo que dio lugar a un incremento en el número de c.p.m.

La concentración del inhibidor afidicolina para el tratamiento T3, fue probablemente a una concentración baja, por lo cual la inhibición no fue total desde el principio de la curva.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

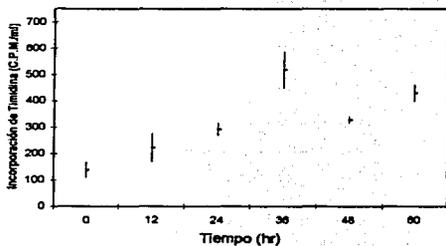
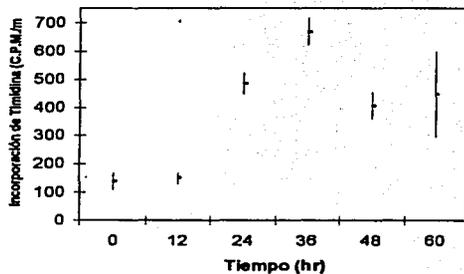
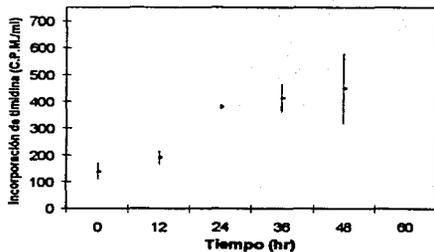
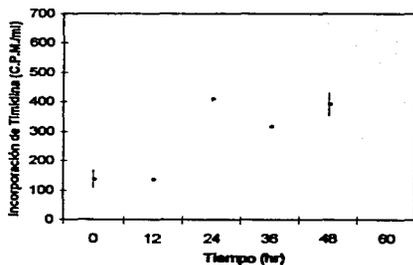
T1**T2****T3****T4**

Figura 19 .Gráficas correspondientes a los tratamientos T1, T2, T3 y T4 donde se muestra el promedio y sus desviaciones estándar



LÁMINA 1. Etapa de inducción de callo originado a partir de Segmentos de Tallo y Hoja en medio C5-0. En la caja de petri de la izquierda se observan los cortes transversales secuenciales colocados en dirección de las manecillas del reloj. En la caja petri de la derecha están distribuidos al azar.



Callo de maiz inducido
de eje embrionario

LÁMINA 2. Etapa de inducción de callo originado a partir de Eje embrionario en medio C5-0.



LÁMINA 3. Etapa de proliferación de callo originado a partir de Segmentos de Tallo y Hoja en medio C5-0. Se observan en la parte superior zonas del callo color blanco hialino.



LÁMINA 4. Etapa de inducción de callo originado a partir del explante Embrión completo en medio C5-0.



LÁMINA 5. Callo originado a partir de Segmentos de Tallo y Hoja en medio C5-0. Cortes transversales de tallo y hoja de maíz, donde se observa que existe mayor formación de callo en los cortes basales del tallo y hoja. El callo originado de los últimos tres segmentos es muy friable y con origen exclusivamente de la última hoja.

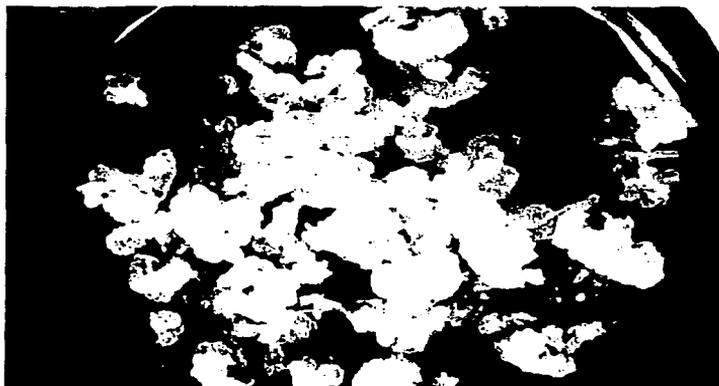


LÁMINA 6. Etapa de inducción de callo originado a partir de Segmentos de Tallo y Hoja en medio C5-0. Se observan en la parte superior zonas del callo color blanco y en regiones inferiores una coloración crema.



LÁMINA 7. Etapa de proliferación de suspensión originada a partir de Segmentos de Tallo y Hoja en medio C5-0. Se observan matraz de 250 ml con 60 ml de células en suspensión. En la parte superior del matraz se observa el halo formado por células pequeñas.

VI CONCLUSIÓN

En la inducción de callo se utilizaron dos explantes, el EE y STH siendo el mejor el STH.

La presencia de L-prolina estimula la inducción de callo de STH de maíz.

El medio con relación de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ de 1:4 (C5-0) es mejor para la inducción de callo de STH que los de relación 1:2. (C3, C4).

En la etapa de Proliferación de callo se probó los medios con relación de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ de 1:2 y 1:4 resultando mejor el 1:4 que el 1:2 igual que en la etapa anterior.

Se evaluó el crecimiento de suspensiones en cinco concentraciones de BAP, siendo mejor el S5 con 0.2 y en general el comportamiento de las concentraciones es dosis respuesta, así mismo se probó la concentración de 2,4-D y se observó que en esta fase es ideal a la concentración 3 en medio S5.

Posteriormente se probó indirectamente que el cultivo estuviera en división mediante curvas de incorporación de timidina y de su posterior inhibición.

El cultivo en suspensión está conformado de células que se encuentran en diferente fase del ciclo celular. La población en nuestro cultivo es heterogénea en su composición, existe cohorte celular en fase Síntesis, otra que se encuentra en mitosis y la gran mayoría está en la fase estacionaria G0.

El inhibidor está a muy baja concentración por lo cual la inhibición de la incorporación no es total y desde el inicio.

Aunque muchos autores utilizan como único parámetro para caracterización de suspensiones el peso fresco, es de gran importancia tomar a la par otros parámetros, tales como el peso seco, y la cuantificación de proteínas, o la incorporación de timidina ya que esto nos denota como se encuentra nuestro cultivo.

VII ANEXOS

ANEXO I

Fórmulas de Macronutrientes utilizadas.

Macronutrientes	P.M.	Cant.Masa	mM · L ⁻¹
Murashige y Skoog (1962) conocido como MS			
Macronutrientes			
KNO ₃	101.108	1900.0	18.792
NH ₄ NO ₃	80.040	1650.0	20.615
CaCl ₂ ·H ₂ O	147.020	440.0	2.993
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246.480	370.0	1.501
KH ₂ PO ₄	136.090	170.0	1.249
Micronutrientes			
MnSO ₄ ·4H ₂ O	205.100	22.3	0.109
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	287.540	8.6	0.030
H ₃ BO ₃	61.860	6.2	0.100
KI	166.010	0.8	0.005
CuSO ₄ ·5H ₂ O	249.680	25.0µg	
MoNaO ₄ ·2H ₂ O	241.950	250.0µg	
CoCl ₂ ·6H ₂ O	237.950	25.0µg	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	278.028	27.8µg	0.100
Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O	372.300	37.3µg	0.369

Medio R₂

Está constituido por todos los macronutrientes y micronutrientes del medio MS, excepto los siguientes, que se presentan a la mitad de la concentración.

Macronutrientes:	P.M.	Mg · L ⁻¹	mM · L ⁻¹
KNO ₃	101.108	85.0	9.396
NH ₄ NO ₃	80.040	825.0	10.807

Skenk and Hildebrandt (1972) (SH)

	P.M.	Mg · L ⁻¹	mM · L ⁻¹
Solución A			
KNO ₃	101.108	2500.00	24.72604
NH ₄ H ₂ PO ₄	115	300.00	2.60870
Solución B			
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246.48	400.00	1.62285
Solución C			
MnSO ₄ ·H ₂ O	169.01	10.00	0.00592
H ₃ BO ₃	61.83	5.00	0.08087
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	287.54	0.10	0.00035
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	241.95	1.00	0.00004
CoCl ₂ ·6H ₂ O	237.93	0.10	0.00004
KI	166.01	1.00	0.00060
CuSO ₄ ·5H ₂ O	249.68	0.20	0.00008

	P.M.	Cant.Masa	mM L ⁻¹
Solución D			
CaCl ₂ . 2H ₂ O	147.02	200.00	0.13604
Solución E			
FeSO ₄ . 7H ₂ O	278.028	15.00	0.00540
Na ₂ EDTA . 2 H ₂ O	372.3	20.00	0.00537

Medio N₆ Chu et al. (1975)

	P.M.	Mg · L ⁻¹	mM · L ⁻¹
Solución I			
(NH ₄) ₂ SO ₄	132.080	483.00	3.50598
KNO ₃	101.108	2830.00	28.01954
CaCl ₂ .2H ₂ O	147.020	166.00	1.12910
KH ₂ PO ₄	136.090	400.00	2.93923
MgSO ₄ 7 H ₂ O	246.480	185.00	0.37731
Solución II			
MnSO ₄ . 4H ₂ O	223.000	597.00	2.67713
ZnSO ₄ .7H ₂ O	287.540	1.50	0.52167
H ₃ BO ₂	61.830	1.60	2.58774
KI	166.010	0.80	0.48190
Solución III			
FeSO ₄ .7H ₂ O	278.028	27.85	0.10017
Na ₂ EDTA . 2 H ₂ O	372.300	37.30	0.10005

Vitaminas del Coctel 20.

Nombre del compuesto	P.M.	mg L ⁻¹	mM L ⁻¹	
L-Asparagina	C ₄ H ₈ N ₂ O. 3 H ₂ O	150.1	10.00	6.662
L-Arginina	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	174.2	10.00	5.741
L-Ac. aspártico	C ₄ H ₇ NO ₄	133.1	7.50	5.635
Glicina	C ₂ H ₅ NO ₂	75.07	23.00	30.638
Glutamina	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	146.1	60.00	41.068
Ac. Glutámico. NaOH	C ₅ H ₉ NO ₄	147.1	7.50	5.099
Biotina (Vit B8)NaOH	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	244.3	1.00	0.409
Ac. Fólico(B9)NaOH	C ₁₈ H ₁₈ N ₇ O ₆	441.4	1.00	0.227
Ac. Nicotínico(B3)	C ₈ H ₅ NO ₂	123.1	1.50	1.219
Pindoxina (B6)*	C ₈ H ₁₁ NO ₃ .HCl	205.6	1.50	0.730
Rivoflavina(B2)NaOH	C ₁₇ H ₂₀ N ₆ O ₃	376.4	0.10	0.027
Tiamina(B1) *	C ₁₂ H ₁₇ CIN ₄ O ₅ .HCl	337.3	3.00	0.889
Myo-Inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.16	145.00	80.484
Urea	CON ₂ H ₄	60.06	45.00	74.925

* Disolver con 3 gotas de NaOH al 1 N

Vitaminas Cocktail R₂

Nombre del compuesto		P.M.	mg L-1	mM L-1
Ac. Nicotínico (B3)	$C_6H_5NO_2$	123.1	1.00	0.813
Mio inositol			100.00	
Piridoxina (B6) *	$C_8H_{11}NO_3.HCl$	205.6	1.00	0.487
Tiamina(B1) *	$C_{12}H_{17}ClN_4O_5.HCl$	337.3	2.00	1.1853

* Disolver con 3 gotas de NaOH al 1 N

Otros compuestos utilizados en el R₂

Nombre del compuesto		P.M.	mg L-1	mM L-1
Glicina	$C_2H_5NO_2$	75.07	1.00	
Adenina. SO ₄		123.1	10.00	

ANEXO II

PARÁMETROS FÍSICOS

Los parámetros físicos se determinaron según Alvarado (1990).

PESO FRESCO (PF): Este parámetro permite determinar la ganancia en masa y volumen del tejido; se obtuvo tanto para callo así como para suspensiones.

A) Callo: Se transfirió 0.7 mg de callo en una caja petri y se pesó en una balanza granataria (gr./plántula), el número de repeticiones varió según experimento y medios, y se describe individualmente en resultados, siendo entre 4 y 7 repeticiones.

B) Suspensiones: Se tomó 1 ml del medio de cultivo y se colocó en un tubo eppendorf previamente pesado, se centrifugó y se eliminó el sobrenadante y por diferencia de pesos se obtuvo el peso fresco. Cada muestreo se hizo por triplicado; el promedio y desviaciones estándares fueron graficadas.

PESO SECO: Mediante la cuantificación de este parámetro se obtuvo la cinética de crecimiento y las fases del cultivo, así como el tiempo de subcultivo. Sólo se utilizó para suspensiones.

A) Suspensiones: Los tubos eppendorf conteniendo las muestras de peso fresco, se mantuvieron a 20°C durante 3 días, posteriormente se pesaron y por diferencia se obtuvo el peso seco.

Los parámetros de crecimiento que se describen posteriormente fueron calculados tanto para callos, como para cultivos en suspensión.

TASA RELATIVA DE CRECIMIENTO (TRC): Es la velocidad promedio a la cual el cultivo aumenta por unidad de masa inicial y por unidad de tiempo.

$$TRC = \frac{\ln C2 - \ln C1}{T2 - T1}$$

Donde:

Ln es el logaritmo natural

C2 es el peso o número de células en el muestreo más tardío

C1 es el peso o número de células en el muestreo más temprano

T2 - T1 es el intervalo en días entre dos muestreos.

TASA DE DUPLICACIÓN (TD): Es el tiempo que requiere una población para que esta duplique su número, o también el tiempo promedio transcurrido entre dos divisiones consecutivas de una célula (Richards, 1969). La ecuación que la describe es:

$$TD = \frac{\ln 2}{TRC}$$

NÚMERO DE DUPLICACIONES (ND): Son el número de veces que la población celular se ha duplicado a un intervalo de tiempo dado.

$$ND = \frac{\ln C2 - \ln C1}{\ln 2}$$

PARÁMETROS BIOQUÍMICOS:

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS: Éste es un parámetro bioquímico que evalúa la proliferación celular del cultivo. El contenido de proteína total se determinó mediante el método de Bradford, utilizando albúmina de suero bovino (BSA) con la cual se hizo la curva patrón de referencia. Muestras de 2 ml de cultivo celular fueron centrifugadas, eliminándose el sobrenadante y adicionando HCl al 1 N. Posteriormente se agitó, se centrifugó nuevamente y tomó muestra de 0.6 ml de sobrenadante. Se adicionó 0.4 ml de colorante azul de Coomassie para posteriormente ser leído en un espectrofotómetro a 595 nm de longitud de onda.

Para la cuantificación de proteínas del ensayo 7, se tomó los eppendorf que contenían 200 µl de la muestra, se les adicionó 0.8 ml del colorante azul de Coomassie y se leyó también en el espectro, a la misma longitud de onda.

ANEXO III

Tabla comparativa de la cantidad de masa y iones Nitrato y amonio en los medios C₃ (R₂), C₄ (MS) y C₅ (N₆).

MEDIO	Cantidad En Masa			Cantidad de Iones			NH ₄ ⁺ del Total De N
	(NH ₄) ₂ SO ₄	KNO ₃	NH ₄ NO ₃	NH ₄ ⁺ (meq)	NO ₃ ⁻ (meq)	Total N (meq)	
C3		950	825	10.3	19.7	30	0.34
C4		1900	1650	20.6	39.4	60	0.34
C5	463	2830		7.0	28.0	35	0.20

Anexo IV

Análisis de Varianza MANOVA.PF – Tipo III Suma de Cuadrados

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	g.l.	Cuadrados Medios	F-Calculada	Sign.
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: MANOVA. Explante	0.0632077	2	0316039	13.377	0.0000
B: MANOVA. Medio	0.0002509	1	0002509	.106	0.7497
C: MANOVA. Fecha	0.0180937	4	0045234	1.915	0.1268
INTERACCIONES					
AB	0.0070742	2	0035371	1.497	0.2360
AC	0.0225126	8	0028141	1.191	0.3286
BC	0.0011178	4	0002795	0.118	0.9752
ABC	0.0033338	8	0004167	0.176	0.9929
TOTAL	0.2088228	69			

20 valores excluidos.

Todas las tasas de F se basaron en el error residual de cuadrados medios.

(Continuación Anexo IV)

Tabla de Últimos Cuadrados Medios para MANOVA.PF

Nivel	Cantidad	Promedio	Error Estandar	95 %	Confidence for mean
Promedios Principales	70	2540500	0.0059161	.2420903	.2660097
A: MANOVA.Explante					
1	20	2964500	0.0108686	.2744786	.3184214
2	20	2179000	0.0108686	.1959286	.2398714
3	30	2478000	0.0088742	.2298605	.2657395
B: MANOVA.Medio					
1	35	2559778	0.0083667	.2390642	.2728913
2	35	2521222	0.0083667	.2352087	.2690358
C: MANOVA.Fecha					
1	14	2700000	0.0132289	.2432573	.2967427
2	14	2563611	0.0132289	.2296184	.2831038
3	14	2726667	0.0132289	.2459240	.2994094
4	14	2408056	0.0132289	.2140629	.2675483
5	14	2304167	0.0132289	.2036740	.2571594
AB:					
1 1	10	3133000	0.0153705	.2822278	.3443722
1 2	10	2796000	0.0153705	.2485278	.3106722
2 1	10	2109000	0.0153705	.1798278	.2419722
2 2	10	2249000	0.0153705	.1938278	.2559722
3 1	15	2437333	0.0125500	.2183630	.2691037
3 2	15	2518667	0.0125500	.2264963	.2772370

ANEXO V

Parámetros de crecimiento celular (TRC, TD y ND) correspondientes a las cinco concentraciones de BAP (S7, S8, S9, S5 y S10) para el explante STH (Segmentos de Tallo y Hoja) de cultivos en suspensión de *Zea mays* L. Raza Chalqueño, (Ensayo 5).

Intervalo de Tiempo	TASAS RELATIVAS DE CRECIMIENTO Tratamiento (Concentración de BAP)				
	S7 (0 mgL ⁻¹)	S8 (0.01 mgL ⁻¹)	S9 (0.1 mgL ⁻¹)	S5 (0.2 mgL ⁻¹)	S10 (1 mgL ⁻¹)
T2-T1	0.560	0.642	0.734	1.464	0.405
T3-T2	-0.154	-0.082	0.040	-0.813	0.368
T4-T3	0.847	0.539	-0.080	0.528	0.037
T5-T4	-1.030	-0.369	0.583	-0.619	-0.037
T6-T5	0.033	0.081	-0.717	0.000	-0.656

Intervalo de Tiempo	TASAS DE DUPLICACIÓN Tratamiento (Concentración de Bap)				
	S7 (0 mgL ⁻¹)	S8 (0.01 mgL ⁻¹)	S9 (0.1 mgL ⁻¹)	S5 (0.2 mgL ⁻¹)	S10 (1 mgL ⁻¹)
t2-t1(12)	1.23900	1.08000	0.944	0.473	1.710
t3-t2(24)	-4.49656	-8.42854	17.4837	-0.8522	1.88299
t4-t3(36)	0.818068	1.28600	-8.61831	1.31369	18.5553
T5-t4(48)	-0.67321	-1.88023	1.18868	-1.1197	-18.5553
t6-t5(60)	21.13494	8.56064	-0.9672	0	-1.05696

Intervalo de Tiempo	NÚMERO DE DUPLICACIÓN Tratamiento (Concentración de Bap)				
	S7 (0 mgL ⁻¹)	S8 (0.01 mgL ⁻¹)	S9 (0.1 mgL ⁻¹)	S5 (0.2 mgL ⁻¹)	S10 (1 mgL ⁻¹)
T2-T1	1.498	1.580	1.673	2.403	1.344
T3-T2	0.536741	0.57225	0.65337	-0.523	1.12724
T4-T3	1.606431	1.22989	0.51575	1.17806	0.63353
T5-T4	-0.64558	0.08363	1.2149	-0.2022	0.54228
T6-T5	0.872642	0.69645	-0.34302	0.69089	-0.05962

Parámetros de crecimiento celular (TRC, TD y ND) de los dos tratamientos (S5 y S8) para los tres explantes (STH, Segmentos de Tallo y Hoja; EC, Embrión con escutelo; EE, Eje embrionario) de cultivos en suspensión de *Zea mays* L. Raza Chalqueño, correspondientes al ensayo 4.

Intervalo de Tiempo	Tasas Relativas de Crecimiento Explante y medio					
	STH S8	STH S5	EC S8	EE S5	EE S8	EC S5
T2-T1	0.179	0.225	0.097	-0.280	-0.126	-0.033
T3-T2	-0.031	0.120	0.087	0.144	-0.028	0.006
T4-T3	-0.090	-0.273	-0.175	-0.066	0.011	-0.127
T5-T4	0.090	-0.181	-0.154	-0.125	0.006	0.012

Intervalo De Tiempo	TASAS DE DUPLICACIÓN Explante y medio					
	STH S8	STH S5	EC S8	EE S5	EE S8	EC S5
T2-T1	0	3.08581	7.14642	-2.4729	-5.49457	-20.838
T3-T2	-22.0403	5.78812	7.97901	4.82724	-24.3848	121.08
T4-T3	-7.68359	-2.53976	-3.96885	-10.532	60.4005	-5.4568
T5-T4	7.683589	-3.83074	-4.48765	-5.5246	122.298	56.934

Intervalo de Tiempo	NÚMERO DE DUPLICACIÓN Explante y medio					
	STH S8	STH S5	EC S8	EE S5	EE S8	EC S5
T2-T1	0.758866	0.80426	0.67663	0.29933	0.45348	0.5464
T3-T2	0.468842	0.59995	0.62357	0.84731	0.60706	0.6001
T4-T3	0.424002	0.15426	0.32359	0.57434	0.85954	0.4648
T5-T4	0.644361	0.36706	0.4211	0.54383	0.64865	0.6602

BIBLIOGRAFÍA

Aheme, W.A., R.S. Campel, and N.A. Wright (1977). An Introduction to Cell Population Kinetics. Eduard Arnold Ltd. London.

Alvarado, O. G., (1990). Caracterización in vivo de la tolerancia de *Chenopodium quinoa* wild a la Salinidad (NaCl). Tesis Colegio de Posgraduados. Instituto en Ciencias Agrícolas centro de Genética Montecillo Mex.

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

Anderson, E., and H.C. Cutler, (1942). Races of Zea mays: I. Their recognition and classification. *Ann. Missouri Bot. Gard*. 29: 69-89.

Aschmore, S. E. and A.R. Gould, (1981). "Karyotype evolution in a tumor derived plant tissue culture analyzed by giemsa Banding": *Protoplast*, 106 (3): 297-308.

Bayley, J. M., J. King., and O. L. Gamborg (1972). The effect of the source of inorganic nitrogen on growth and enzymes of nitrogen assimilation in soybean and wheat cells in suspension cultures. *Planta*. 105: 15-24.

Bevan, M., and D.H. Northcote, (1981). Some rapid effects of synthetic auxins on mRNA levels in cultured plant cells. *Planta*. 152: 32-35.

Bewley J.D. and M. Black (1994) Seeds. Physiology of development and Germination, 2^a. Ed. Plenum Press, New York.

Boyes, C.K. , F. J. Zapata and K. C. Sink (1980). Isolation, culture and regeneration to plants of callus protoplasts of *Salpiglossis sinuata* L. *Z. Pflanzenphysiuk*. 99: 471- 474.

Brar, D.S., S. Rambold, O.L. Gamborg and F. Constabel (1979). Tissue culture of Corn and Sorghum. *Z. Pflanzenphysiol*. 95: 377-388.

Britikov, E.A., J. Schauwen, H.F. Linskens (1970). Proline as a source of nitrogen in plant metabolism. *Acta Bot. Neerl*. 19: 515-520.

Brown, S., D.f. Wetherell, and D.K. Dougall (1976). The potassium requirement for growth and embryogenesis in Wild carrot suspension culture. *Physiol. Planta*. 37: 73-79.

Brown T. (1990). Initiation and Maintenance of callus culture in plant cell and tissue culture. Method in Molecular Biology. Vol 6. Humana Press, New Jersey.

Bryant, J. A., P. N. Fitchett, S. C. Hughes and D. R. Sibson (1992). DNA polymerase α in Pea is part of a large multiprotein complex. *J. Exp. Bot*. 43: 31-40.

Butcher, D.N. and D.S. Ingram (1974). Plant tissue culture. Studies in Biology. Núm. 65, The Camelot Press L. T. D., Southampton, Gran Bretaña.

Campbel J. L. (1990). Methods in Enzymology. DNA Replication. Vol. 262. Edited by. Academic Press. San Diego.

Carlson, P. S. (1970). Introduction and isolation of auxotrophic mutants in somatic cell cultures of *Nicotiana tabacum*. *Science*. 168: 487-489.

Coello, P., and J.M. Vázquez-Ramos (1995a). Maize Dna polymerase 2 is a phosphoprotein with increasing activity during germination. *Eur. J. Biochem*. 231: 99-103.

Coello P., and J.M. Vázquez-Ramos (1995b). Studies on the processivity of maize DNA polymerase 2, an α -type enzyme. *Plant Physiol*. 109: 645-650.

Coello, P., R. Rodríguez, E. García and J.M. Vázquez-Ramos (1992). A Dna polymerase from maize axes: its purification and possible role. *Plant Mol. Biol*. 20: 1159-1168.

Conger, B.V., F. J. Novak, R. Afza and K. Erdelsky (1987). Somatic embryogenesis from cultured leaf segments of *Zea mays*. *Plant Cell Reports*. 6: 345-347.

Copping L. and H.E. Street (1972). Properties of the invertases of cultured Sycamore cells and changes in their activity during culture growth. *Physiol. Plant* 26: 347-354

Chandler, S. F. and I.K. Vasil (1984). Optimization of plant regeneration from long term embryogenic callus cultures of *Pennisetum purpureum* Schum (Napier grass). *J. Pl. Physiol*. 117: 147-156.

Chang, C.C., J.A. Boezi, ST Warren, C.L.K. Sabourin, P.K. Lui, L. Glatzer, , J.E Trosko, (1981). *Somatic Cell Genet* 7:235; Krokan, H. Wist E, Krokan, R.H (1981) *NAR* 9:4709.

Chu, C.C., C.C. Wang, C.S. Sun, C. Hsu, K.C. Yin, C.Y. Chu and F.Y. Bi (1975). Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sin.(Peking)* 18: 659-668.

Davies, W. J. and H. G. Jones (1995). Physiology and Biochemistry, Bios Scientific, Publishers, Oxford.

Dixon, R. A. (1985). Plant Cell Culture. A Practical approach. Oxford.

Doebley , J.F., M.M. Goodman and C.W. Stuber (1985). Isozyme variation in the races of maize from Mexico. *Am.J.Bot.* 72: 629-639.

Doebley, J.F., and H. H. Iltis. (1980). Taxonomy of *Zea* (Gramineae). I. A subgeneric classification with key to taxa. *Am. J. Bot.* 67: 982-993.

Downey K. R., W. Voellmy, F. Ahmad and J Schultz (1983). Advances in Gene Technology: Molecular Genetics of Plants and Animals (Eds.). Academic Press. New York.

Eriksson, T. (1965). Studies on the growth requirements and growth measurements of cell cultures of *Haplopappus gracilis*. *Physiol. Plant.* 18: 978-993.

Essau K. (1976). Anatomía Vegetal. Ed. Omega. Barcelona, España.

Filner, P. (1966). Regulation of nitrate reductase in cultured tobacco cells. *Biochim. Biophys. Acta* 118: 299-310.

Fiona, A. Redway, V. Vasil and I. Vasil (1990). Characterization and regeneration of Wheat (*Triticum aestivum* L.) embryogenic cell suspension cultures. *Plant Cell Reports.* 8: 714-717.

Fowler, M. W. (1971). Studies on the growth in culture of plant cells: XIV. Carbohydrate oxidation during the growth of *Acer pseudoplatanus* L. Cells in suspension culture. *J.Exp.Bot.* 22: 715-724.

Freeling, M. and V. Walbot (1994). The Maize HandBook. Springer-Verlag. New York.

Galinat, W.C. (1992). Evolution of com. *Adv. Agron.* 47: 203-231.

Gamborg, O.L., and D.E. Eveleigh (1968). Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley. *Can. J. Biochem.* 46: 417-421.

Gamborg, O.L., R.A. Miller and K. Okjima (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.

Garcia, E., D. Orjuela, Y. Camacho, J. Zúñiga, J. Plasencia And J. Vázquez-Ramos (1997). Comparison among DNA polymerases 1, 2 and 3 from maize embryo axes. A DNA primase activity copurifies with DNA polymerase 2. *Plant Molecular Biology.* 33: 445-455.

George, E. F., and P. D. Sherrington (1984). Plant Propagation by Tissue Culture. Exegetics Limited. Great Britain.

Goodman M.M. (1988). The history and evolution of maize. *CRC Critical Rev. Plant Sc.* 7:197-220.

Green C. E., R. L. Phillips, and R. A. Kleese (1974). Tissue culture of Maize (*Zea mays* L.) : Initiation, Maintenance, and Organic growth factors. *Crop Science*. 141: 54-58.

Halperin W. and D. F. Wetherell (1965). Ammonium requirement for embryogenesis in vitro. *Nature* 205: 519-520.

Hart J. W., and O. Filner (1969). Regulation of sulfate uptake by amino acids in cultured tobacco cell. *Plant Physiol*. 44: 1253-1259.

Henar V. M., (1996). Ciclo Celular. *Investigación y Ciencia*. 10: 34-38.

Heyser, J.M. (1984). Callus and shoot regeneration from protoplasts of proso millet (*Panicum millaceum* L.) *Z. Pflanzenphysiol*. 113: 293-299.

Ho, W., and I.K. Vasil (1983). Somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) II. The growth of and plant regeneration from embryogenic cell suspension cultures. *Ann. Bot. (London)*. [N.S.] 51: 719-728.

Hurtado, D., y M. Merino (1988). Cultivo de Tejidos Vegetales. Ed. Trillas

In-Suk Park and K. Dong-II (1993) Significance of Fresh Weight to Dry Cell Weight ratio in plant cell suspension cultures. *Biotechnology techniques*. 7 No. 9: 627-630.

Kamada, H., and H. Harada (1979). Studies on the organogenesis in carrot tissue cultures. II. Effects of aminoacids and inorganic nitrogenous compounds on somatic embryogenesis. *Z. Pflanzenphysiol*. 91:453- 463.

Kanamori, I., H.Ashihara, and A. Komanine, (1979). Changes in the activities of the pentose phosphate pathway and pyrimidine nucleotide biosynthesis during the growth of *Vinca rosea* cells in suspension culture. *Z. Pflanzenphysiol*. 93: 437-448.

Kato, Y., A.T. 1984. Chromosome morphology and the origin of maize and its races. *Evol. Biol*. 17:219-253.

Khaukin, E. E., and N. N. Varakina (1981). Respiration of maize cells in batch suspension cultured as compared to the intact root tip and coleoptile. *Z. Pflanzenphysiol*. 104: 419-429.

Sala F., B. Paris, R. Cella, and O. Ciferri (1980). Plant Cell Cultures: Results and perspectives. Elsevier, N. Holland.

King, P.J. (1980). Cell proliferation and growth in suspension culture. *Int. Rev. Cytol.*, Syook, 11: 25-53.

King, P.J., I. Potrykus, and E. Thomas (1978). *In vitro* genetics of cereals: Problems and perspectives. *Physiol. Veg.* 16: 381-399.

Kite, L. (1987). Plants from test Tubes. An Introduction to micropropagation. Timber Press. Portland Oregon.

Kuberski, C., H. Scheibner, C. Steup, B. Dietrich, And M. Luckner (1984). Embryogenesis and cardenolide formation in Tissue cultures of *Digitalis lanata*. *Phytochemistry.* 23: 1407-1412.

Laetsch, W.M., and D.A. Stetler (1965). Chloroplast structure and function uncultured tobacco tissue. *Am. J. Bot.* 52: 798-884.

Lewin, B. (1997). Genes VI. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokio.

Lindsey, K., and M. M. Yeoman. (1983). Relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures. *J. Exp. Bot.* 34: 1055-1065.

Lu, C., and I.K Vasil, (1981). Somatic embryogenesis and plant regeneration from freely suspended cells and cell groups of *Panicum maximum* *in vitro*. *Ann. Bot. (London) [N.S.]* 47: 543-548.

Lu, C., I.K Vasil, and P. Ozias-Akins (1982). Somatic embryogenesis in *Zea mays* L.. *Theoret. Appl. Genet.* 62: 109-112.

Lu, C., Vasil, V. and I.K Vasil (1983). Improved efficiency of somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of maize (*Zea mays* L.). *Theoret. Appl. Genet.* 66: 185-289.

Lu, C., Vasil, V., and I.K Vasil (1981). Isolation and culture of protoplasts of *Panicum maximum*. *Jacq. (Guinea grass): Somatic embryogenesis and plantlet formation. Z. Pflanzenphysiol.* 104: 311-318.

MacNeisk, R. S. 1985. The archaeological record on the problem of the domestication of maize. *Maydica* 30: 171-178.

McIntosh, J.R., and M.P.Koonce. (1989). *Mitosis. Science.* 246: 622-627.

McWilliam, A. A., S. M., Smith and H. E. Street (1974). The origin and development of embryos in suspension cultures of carrot (*Daucus carota*): Ann. Bot. 38: 243-250.

Méndez, D. G.(1998). El medio condicionado en cultivos celulares de maíz en suspensión. Efecto en el crecimiento y en el aparato traductor. Tesis UNAM.

Moore, T. C. and C. Thomas (1989). Biochemistry and Physiology of Plant hormones. Second Edition. Springer-Verlag.

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

Nikoleava, L.A., y A. G. Volosovich (1972). Effect of auxin on the biosynthesis of tropane and indole alkaloids. Rastit. Resur: 8: 188-192.

Novak, F.J., M. Dolezelova, M. Nesticky, and A. Piovarci (1983). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Zea mays* L.. Maydica 28: 381-391.

Ohira, K., K. Ojima, M. Saigusa and A. Fujiwara (1975). Studies on the nutrition of rice cell culture. II Microelement requirement and the effects of deficiency. Plant Cell Physiol. 16: 871-873.

Okamura, M., T. Hayashi, and S. Miyazaki (1984). Inhibiting effect of ammonium ion in protoplast culture of some *Asteraceae* plants. Plant Cell Physiol. 25: 281- 288.

Omröd J. C. And D. Francis (1993). Molecular and Cell Biology of the Plant Cell Cycle. Kluwer Academic Publisher. Printed in the Netherlands.

Fujiwara, A. (1982). Plant Tissue culture. Proc. 5th Int. Long.

Oswald, T.H, R.L. Nicholson and L.F.Bauman (1977). Cell suspension and callus culture from somatic tissue of maize. Physiol. Plant. 41: 45-50.

Pardee, A. B. (1989). G1 Events and regulation of cell proliferation. Science. 246: 603-608.

Polikarpochmina, R.T., K.Z.Gamburg and E.E. Khavkin (1979). Cell suspension culture of maize (*Zea mays*, L.) Z. Pflanzenphysiol. 95: 57-67.

Protikus, I., C.T.Harms, and H. Lorz. (1979). Callus formation from cell culture protoplasts of corn (*Zea mays* L.) Theor. Appl. Genet. 54: 209-214.

Prioli, L.M., and M. R.Söndahl (1989) Plant regeneration and recovery of fertile plants from protoplasts of maize (*Zea mays* L.). Biol.Technol. 7: 589-594.

Rangan, T.S. and I.K. Vasil, (1983). Sodium chloride tolerant embryogenic cell lines of *Pennisetum americanum* (L.). Theor. Appl. Genet. 54: 209-214.

Raven P.H., R.F. Evert and S.E. Eichhorn (1999). Biology of Plants. Sbth edition. Edit. Freeman, Worth.

Reinert, J., M. Tozawa, and Semeroff (1967). Nitrogen compounds as factors of embryogenesis in vitro. Nature. 216: 1215-1216.

Sala, SF., F.Sala. and G.Petrali-Noy (1982). Aphidicolin: a specific inhibitor of nuclear DNA replication in eukaryotes. Trends Biochem. Sci., 7: 29.

Salisbury, F. B. (1959). Growth regulators and Flowering. II The cobaltous ion. Plant Physiol. 34: 598-604.

Salisbury, F. B. and C. W. Ross (1992). Plant Physiology, fourth edition, Wadworth Publishing Co., Belmont, Ca.

Savidge, R.A. (1983). The role of plant hormones in higher plant cellular differentiation 11. Experiments with the vascular cambium and sclereid and tracheid differentiation in the pine *Pinus contorta*. Histochem.J. May. 15 (5): 447-466.

Schöder, J., Betz and K.Hahibbrook. (1978) Messenger RNA-controlled increase in phenylalanine ammonia-Lyase activity in parsley: Light-independent induction by dilution of cell suspension culture into water. Plant Physiol. 60: 440-445

Shannon, J.C, and J.W. Lui (1977). A simplified medium for the growth of maize (*Zea mays*) endosperm tissue in suspension culture. Physiol. Plant. 40: 285-291.

Shenk, R. V and A. C. Hildebrandt (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can. J. Bot. 50: 199- 204.

Shepard, J., F., and R. E. Tottlen (1977). Mesophyl cell protoplast of potato: isolation, proliferation and plant regeneration. Plant Physiol. 60: 313-316.

Sheridan, W.F. (1977). Tissue culture of Maize. II Effect of The Glutamate, Aspartate, γ and Aromatic Amino Acid Families of Callus Growth of Several Maize Strains.

Singh, M., and A. D.Krikorian (1980). Chelated iron in culture media. Ann Bot. 46: 807-809.

Sozinov, A., S.Lukjanjuk and S.Ignatova (1981). Anther cultivation and induction of haploid plants in triticale. Z. Pflanzenzücht. 86: 272-285.

Spadari, S., F. Sala, and G. Pedrall-Noy (1982). Aphidicolin: a specific inhibitor of nuclear ADN replication in Eukaryotes. Trends. Biochem. Sci. 7: 29-31.

Srinivasan, C., and I.K. Vasil (1985). Callus formation and plantlet regeneration from sugarcane protoplasts isolated from embryogenic cell suspension cultures. Amer. J. Bot. 72: 833-838.

Street, H. E. (1977). Plant Tissue and Cell culture. Bot Monographs. Vol. II Blackwell. Scientific Publications.

Stuart, D. A., and S. G.Strickland (1984). Somatic embryogenesis from cell cultures of *Medicago sativa* L. 1. The role of amino acid additions to the regeneration medio. Planta Sci. Lett. 34: 165-174.

Stewart, C.R., C.J.Morris and J.F.Thompson (1966). Changes in amino acid content of excised leaves during incubation II. Role of sugar in the accumulation of proline in silted leaves. Plant Physiol. 41: 1585-1590.

Sweet H.C. and Bolton W.E. (1979) The surface decontamination of seeds to produce axenic seedlings. Amer. J. Bot. 66(6): 692-698.

Thomas, E., and H. E. Street (1970). Organogenesis in cell suspension cultures of *Atropa belladonna* L. and *Atropa belladonna* cultivar lutea DOI L. Ann. Bot. 34: 657-669.

Trigiano, R.N. and B.V.Conger (1987). Regulation of growth and somatic embryogenesis by proline and serine in suspension cultures of *Dactylis glomerata*. J. Plant Physiol. 130: 49-55.

Tulecke, W. and L. G. Nickell (1959). Production of large amounts of plant tissue by submerged culture. Science. 130: 863-864.

Tulecke, W., and L. G. Nickell (1960). Methods, problems, and results of growing plant cells under submerged conditions. Trans, N. Y., Acad. Sci. 22: 196-204.

Turnham, E., and D.H. Northcote (1982). The use of acetyl-CoA carboxylase activity and changes in wall composition as measures of embryogenesis in tissue cultures of oil palm. Biochem. J. 208 (2):323-332.

Vain, P., H. Yean and P. Flament (1989). Enhancement of Production and Regeneration of Embryonic Type II Callus in *Zea mays*, L. By AgNO₃. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 18: 143-151.

Vasil I. K. (1985): Cell culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 1. Laboratory Vasil et al., Procedures and Their Applications. Academic Press, Orlando.

Vasil, I. K., (1985). Cell culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 2 . Academic Press, Inc.

Vasil, J. K. and A. C. Hildebrandt (1966). Growth and chlorophyll production in plant callus tissues grown in vitro. *Planta*. 68: 69-82.

Vasil, V. and I.K.Vasil (1979). Isolation and culture of cereal protoplasts. I. Callus formation from pearl millet (*Pennisetum americanum*) Protoplasts. *Z. Pflanzenphysiol.* 92: 379-383.

Vasil, V. and I.K Vasil (1982). Characterization of an embryogenic cell suspension culture derived from inflorescences of *Pennisetum americanum* (pearl millet, Gramineae). *Am. J. Bot.* 69: 1441-1449.

Vasil, V. and I.K.Vasil (1980). Isolation and culture of cereal protoplasts. II . Embryogenesis and plantlet formation from protoplasts of *Pennisetum americanum*. *Theoret. Appl. Genet.* 56: 97-99.

Vasil, V. and I.K.Vasil (1981). Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of pearl millet (*Pennisetum americanum*). *Ann. Bot. (London) [N.S.]* 47: 669-678.

Vasil, V. D.Wang, and I.K.Vasil, (1983). Plant regeneration from protoplasts of Napier grass (*Pennisetum purpureum* Schum). *Z. Pflanzenphysiol* 111: 233-239.

Vasil, V., I.K.Vasil and C. Lu (1984). Somatic embryogenesis in long term cultures of *Zea mays* L. (Gramineae). *Amer. J.Bot.* 71: 158-161.

Verma, D.P.S. and A. Marcus (1974). Activation of protein synthesis up on dilution of *Aractus* cell culture from the stationary phase. *Plant Physiol.* 53: 83-84

Wellhausen, E.J. L.M.Roberts and E. X. Hernandez, in collaboration with P.C. Mangelsdorf. (1952). Races of maize in Mexico. Bussey Institution, Harvard University, Cambridge, MA.

White, P. R. (1943). A Handbook of Plant Tissue culture, J. Cattell Press. Lancaster, P.A In: Tissue culture of Maize (*Zea mays* L.) : Initiation, Maintenance, and Organic growth factors. *Crops Science.* 14: 54-57.

Wilkes, H.G. (1967). Teosinte: the closest relative of maize. Bussy Institution, Harvard University, Cambridge, M.A.