



**Universidad Nacional Autónoma de México**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS  
PROFESIONALES IZTACALA**

**EMBRIOGENESIS SOMATICA EN  
VARIEDADES DE ALFALFA  
(Medicago sativa L.) DE IMPORTANCIA  
EN MEXICO**

**TESIS PROFESIONAL**

Que para obtener el título de:  
**B I O L O G O**  
P R E S E N T A:  
**SARA ISABEL FUENTES MEMBREÑO**

Los Reyes Iztacala, Edo. de México.

1988



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

Todo el material contenido en esta tesis 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.



ESCUELA DE GRADUADOS  
PROFESIONALES GUATEMALA

"Ten cuidado de las cosas de la tierra:  
haz algo, corta leña, labra la tierra,  
planta nopales, planta magueyes,  
tendrás qué beber, qué comer, qué  
vestir, con eso estarás de pie, serás  
verdadero, con eso andarás,  
con eso se hablará de tí, se te  
alabará, con eso te darás a conocer".

HUEHUETLATOLLI



ESTE TRABAJO SE REALIZO EN LAS INSTALACIONES DEL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES DEL DEPARTAMENTO DE BIOFISICA DE LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DEL I.P.N., BAJO LA DIRECCION Y ASesorIA DE LA M. en C. THELMA L. VILLEGAS GARRIDO.

## RECONOCIMIENTOS

Deseo hacer patente mis más sincero agradecimiento

A la M. en C. Thelma L. Villegas por su asesoría y apoyo incondicional para la realización de este trabajo y por brindarme su amistad.

A el Ing. Luis Castro Acero del Campo Experimental "El Horno" INIFAP, por su valiosa información y ayuda.

A mis compañeros del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Biofísica y del Departamento de Fisiología Vegetal de la E.N.C.B. por su apoyo y amistad.

A mis profesores y sinodales de la ENEP Iztacala M. en C. Ernesto Aguirre León, Biól. Alberto Arriaga Frías, Biól. Gerardo Ortiz y Biól. Martín Vargas, por compartir sus enseñanzas y por sus valiosas sugerencias a este trabajo.

A mis compañeros del grupo 03 con quienes viví experiencias inolvidables y con quienes siempre he contado.

A mi querida escuela ENEP Iztacala, en cuyas aulas comencé mi formación profesional.

A mis amigos, porque gracias a que la vida estrechó nuestros caminos, hemos compartido momentos trascendentales de nuestro existir.

\* \* \*

## DEDICATORIA

A mi amiga de siempre, mi madre,  
por ser mi más fiel apoyo, ejemplo  
de tenacidad, comprensión y cariño;

a la memoria de Angelina Alvarado,  
Sara Membreño e Isabel Fuentes, por  
su afecto sincero;

a Martha, Ramón, Alejandro Adán y  
Alejandro Membreño;

a la memoria de Ramón Membreño, que  
con su "Explotación de un ható", me  
inspiró a seguir adelante.

# CONTENIDO

	Página
RESUMEN	
I. INTRODUCCION	1
II. REVISION BIBLIOGRAFICA	4
Características botánicas	4
Ecología de la alfalfa	7
El cultivo de la alfalfa	7
Genética y citotaxonomía	8
Origen e historia de la alfalfa	9
La alfalfa en México	10
Distribución y producción en México	13
Embriogénesis somática <i>in vitro</i>	15
Factores que controlan la embriogénesis <i>in vitro</i>	16
Sistemas de regeneración <i>in vitro</i> de alfalfa	22
III. OBJETIVOS	32
IV. MATERIAL Y METODOS	33
Selección del material biológico	33
Medios de cultivo	33
Condiciones físicas	38
Desinfestación y germinación de las semillas	38
Siembra de los tejidos	38
V. RESULTADOS	40
Selección y obtención de germoplasma de alfalfa	40
Respuesta de las diez variedades en cultivo	40
Obtención y desarrollo de los embriones somáticos	62
VI. DISCUSION	69
VII. CONCLUSIONES	79
VIII. BIBLIOGRAFIA	82
APENDICE A	89

## RESUMEN

La alfalfa es la leguminosa forrajera por excelencia. Su cultivo en México se ha venido realizando desde su introducción como una aportación más al Nuevo Continente. La problemática que ahora enfrentan los agricultores incluye a la obtención de variedades certificadas que garanticen una buena producción, adaptabilidad a las condiciones climáticas prevalentes en nuestro país, resistencia a plagas y enfermedades y disminuir los insumos que representa la importación de variedades comerciales de semilla.

Las técnicas del cultivo de tejidos vegetales ofrecen una alternativa más de las que tradicionalmente se están ya aplicando para ayudar a solventar esta problemática. Esta metodología ya ha sido exitosamente aplicada a varios tipos de cultivos de importancia económica. En el caso de cereales y leguminosas no ha sido fácil establecer estos sistemas de cultivo de tejidos. Para alfalfa, desde hace más de quince años se ha tratado de implementar un propio sistema de regeneración de plantas *in vitro* y se ha demostrado que estos sistemas son genotipo-dependientes. Es un hecho que en la actualidad no existe un protocolo de cultivo común que abarque la exitosa obtención de plantas para la totalidad del germoplasma de alfalfa. Los autores se han remitido a realizar, en primera instancia, un sondeo con un número considerable de variedades, para luego seleccionar a aquel material que muestre una respuesta positiva en los cultivos.

Este estudio maneja este mismo propósito de observar la respuesta en cuanto a embriogénesis somática de algunas variedades de alfalfa que son agrónomicamente importantes en nuestro país. Se trabajaron cuatro protocolos de cultivo de los tejidos *in vitro* previamente establecidos para otras variedades de alfalfa y se manejaron nueve variedades de esta leguminosa que se cultivan en México, que de acuerdo a su linaje genético quedan enmarcadas dentro de la especie *Medicago sativa* material considerado, según la literatura, como de baja respuesta embriogénica dentro de los cultivos *in vitro*.

Cinco variedades: Velluda Peruana, Moapa 69, Sintético II Hidalgo, Valenciana y Sintético I Jardín además de la variedad control A 70-34, formaron embriones somáticos en los cultivos con un potencial de regeneración de 4 a 10% y rendimientos de 1 a 12 embriones por callo en promedio. Sin embargo en estos cultivos de callos para siete variedades se observaron características que catalogamos de inducción positiva en cuanto a la formación de embriones somáticos que generalmente no culminaron en tal. La influencia del medio de cultivo de regeneración en este punto resalta enormemente así como en la calidad o desarrollo ulterior de los embriones somáticos en su conversión a plantas, lo cual se verificó en este trabajo en que la mayoría de los embriones somáticos mostró anomalías en su morfología por lo que su conversión

a plantas normales no fué evidente.

Se discuten ampliamente los factores que están involucrados en esta vía morfogénica para la obtención de plantas por cultivo de tejidos vegetales y en particular para alfalfa. Sobresale la interacción entre el genotipo del material vegetal, el medio de inducción suplementado con la auxina sintética ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el medio de regeneración que debe contar con niveles adecuados de nitrógeno bajo la forma de ion reducido.

## I. INTRODUCCION.

La alfalfa ha sido desde hace más de 400 años la leguminosa más importante y más cultivada de México, tanto por la cantidad de forraje obtenido por superficie cultivada como por ser la fuente económica de proteína para ruminantes domésticos (bovinos, caprinos y ovinos), para ganado vacuno, porcino, caballar y aves de corral. Su alto valor nutritivo se expresa tanto en el alto contenido de proteína total que fluctúa entre un 11 y un 20% de acuerdo a su estado en seco o en fresco respectivamente, así como de otros elementos minerales como el calcio, el potasio (Juscafresa, 1974) y por ser una buena fuente de vitaminas A y K (Magallanes, 1986). Todo lo anterior se traduce finalmente en la alta calidad de productos de origen animal para el consumo humano. (Tablas 1 y 2).

Tabla 1. Contenido proteico de la alfalfa en sus diferentes formas como alimento para el ganado (Hanson *et al.*, 1978)

	Porcentaje de proteína
Harina de hoja de alfalfa	20.0
Alfalfa deshidratada	16.5
Harina de alfalfa	15.0
Harina de tallo de alfalfa	11.5
Heno de alfalfa	10.5

Además, la alfalfa resulta ser un alimento apetecible y digerible por un gran número de especies animales ya sea en estado fresco, henificada deshidratada, ensilada o transformada en harina (Juscafresa, 1974) y últimamente se le incluye en la dieta humana en forma de licuados, germinados, panes y otros guissos.

Otra cualidad importante de esta leguminosa forrajera es su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico al establecerse el fenómeno de simbiosis entre las células de sus raíces y las bacterias del género *Rhizobium* (Claverán, 1978) lo cual permite al agricultor disminuir los costos de fertilizantes nitrogenados en los alfalfares, además de que aumenta el contenido de materia orgánica en el suelo (Mela, 1963), controla la erosión y puede utilizarse en sistemas de rotación de cultivos (Buller, 1958; Donahue *et al.*, 1962).

Por otro lado la producción de esta forrajera en nuestro país enfrenta algunos problemas que limitan de manera significativa su rendimiento, entre los que destacan: (1) la presencia de plagas y enfermedades; (2) la escasez de agua de riego en las zonas de cultivo, sobretodo si se considera que este cultivo requiere de importantes cantidades del líquido vital para su desarrollo y producción; (3) la certificación de variedades de semilla que estén adaptadas a las diferentes áreas ecológicas de

nuestro país y (4) la preservación adecuada de germoplasma valioso.

Tabla 2. Composición química de la alfalfa en seco (Artigas, 1984).

Proteínas		18%	
Grasas		3%	
Hidratos de carbono		40%	
Humedad		7%	
Fibra		25%	
Minerales		18%	
<hr/>			
Elementos minerales	mg/100g	Vitaminas	mg/100g
Potasio	2000	Caroteno (Provit A)	44000 **
Calcio	1750	Ac ascórbico (Vit C)	176
Magnesio	310	Vitamina D	1040 **
Azufre	290	Tocoferol (Vit E)	50 **
Cloro	280	Vitamina K	15 **
Fósforo	250	Tiamina (Vit B1)	0.8
Sodio	150	Rivoflavina (Vit B2)	1.8
Hierro	35	Ac nicotínico	5.0
Manganeso	5	Ac pantoténico	3.3
Cobalto	2.4	Vitamina B6	1.0
Boro	4.7	Inositol	210.0
Cobre	2.0	Biotina	0.03
Molibdeno	2.6 *	Ac fólico	0.8
Trazas de zinc, níquel, estroncio, plomo y paladio.		Vitamina B12	0.03 ***

\* partes por millón

\*\* U.I. unidades internacionales.

\*\*\* mcg/100g.

Con el creciente progreso de la micropropagación *in vitro* se ha creado mucho entusiasmo en cuanto a el uso de esta tecnología en el mejoramiento de plantas agrícolamente importantes (Conger, 1980). Dentro de las especies agronómicas que pueden tener gran potencial en cuanto a el empleo de estas técnicas para su propagación se incluye a aquellas que se propagan vegetativamente para conservar material importante, aunque comercialmente se le cultive por semilla como es el caso de la alfalfa.

Una de las muchas aplicaciones de estos sistemas de cultivo *in vitro* disponible como una aplicación inmediata es bajo los términos de propagación clonal de material valioso. Aunque como menciona Conger (1980), esta metodología para propagación clonal así como para propagación masiva es en general poco empleada para la mayor parte de los cultivos agronómicos por razones diversas, pero a pesar de ello la micropropagación se propone como un valioso apoyo a los Programas de Mejoramiento Genético incluyen-



do lo relativo a selección, propagación y clonación de genotipos deseables, la inducción y selección de mutantes por mencionar algunos ejemplos.

Con todos estos antecedentes y la problemática vigente en cuanto a la certificación de semilla, obtención de nuevas variedades con características agronómicas deseables, el mantenimiento y conservación de un buen banco de germoplasma de esta forrajera, aunado a la importancia que de por sí tiene la alfalfa, hace justificable el impulso de las diversas metodologías que ofrece el cultivo de células y tejidos vegetales para apoyar a aquellos programas de implementación y mejoramiento agrícola tendientes a superar estos obstáculos y que permitan el desarrollo y progreso de este cultivo en México.

## II. REVISION BIBLIOGRAFICA.

Como precedente, a continuación se señalan algunas consideraciones preliminares sobresalientes de la alfalfa como planta y como cultivo.

### CARACTERISTICAS BOTANICAS.

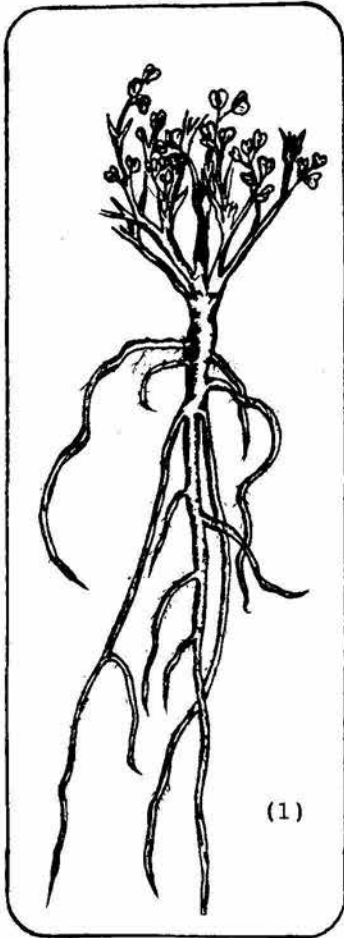
La ubicación taxonómica de la alfalfa, de acuerdo con el sistema de clasificación de Lawrence (1951) y Cronquist (1968) citado por Radford *et al.*, (1974), es la siguiente:

Reino	VEGETAL
División	EMBRYOPHYTA
Subdivisión	ANGIOSPERMAE
Clase	DICOTYLEDONAE
Subclase	ROSIDAE
Orden	ROSALES
Familia	LEGUMINOSAE
Subfamilia	FABACEAE
Género	<i>Medicago</i>

Hanson (1972) cita 126 especies de alfalfa distribuidas por todos los continentes, de donde la más conocida es la alfalfa común *Medicago sativa* L. aunque también pueden mencionarse *M. medica* Pers., *M. falcata* L., *M. borealis* Grossh., *M. lupulina* L., *M. arborea* L., *M. coerulea* Less., *M. arabica* Huds., entre otras.

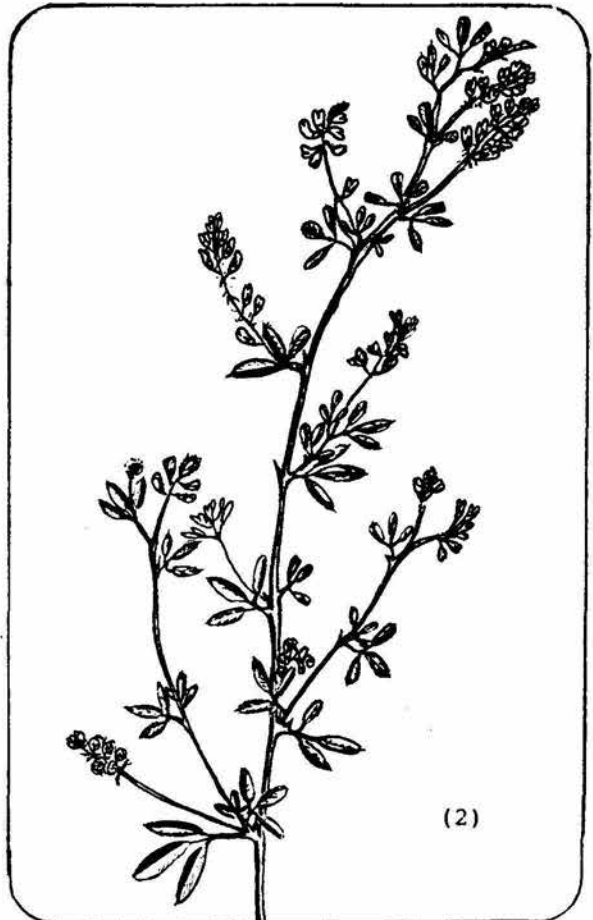
En cuanto a su descripción botánica, la alfalfa es una planta herbácea perenne, que botánicamente se le clasifica dentro de la familia de las Leguminosas. Posee un sistema radicular en el que la raíz principal llega a alcanzar 7.5 a 9 metros de profundidades después de varios años y las raíces secundarias llegan a ser más bien superficiales; de tallos erectos y finos, ramificados que suelen alcanzar una altura de 60 a 90 centímetros, suelen crecer de 5 a 25 tallos de una corona leñosa de la que brotan los tallos jóvenes cuando los anteriores se maduran o se cortan; las hojas son trifoliadas con folíolos ovales, lineares y dentados en el ápice; estípulas soldadas al peciolo; flor irregular amariposada, libre y pequeña, de color morado, amarilla o variegadas, agrupadas en racimos; cáliz gamosépalo, corona papilionácea, caediza con un pétalo estandarte, dos pétalos ala y dos pétalos quilla; diez estambres, nueve de los cuales unidos por los filamentos quedando sólo uno libre; pistilo con un solo carpelo cerrado en el que se desarrolla un ovario súpero, unilocular con varios óvulos anátropos; el estilo es liso y filiforme; el fruto es una legumbre curva con vueltas en espiral donde se encuentran varias semillas reniformes de color amarillo verdoso, brillantes, con una cicatriz en una depresión ancha cerca de un extremo, longitud aproximada de 1.5 mm (Mela, 1963; Hanson *et al.*, 1978; Robles, 1979). (Ver figuras 1 a 5).

## LA PLANTA DE ALFALFA



(1)

Fig. 1 Planta mostrando el extenso sistema radicular y varios tallos jóvenes a partir de la corona.



(2)

Fig. 2 Ramas florales en desarrollo.

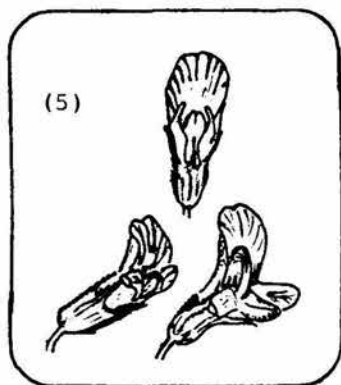
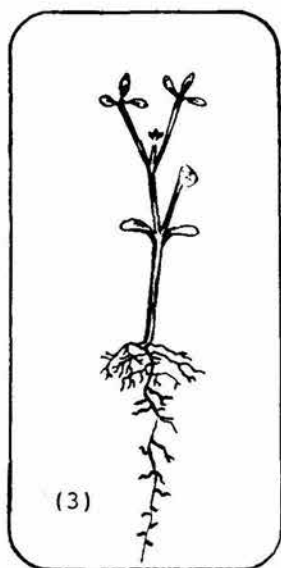


Fig. 3 Plántula de seis semanas de edad.

Fig. 4 Rama con varios frutos, legumbres típicas, cuatro semillas de tamaño real y dos semillas arriñonadas en aumento.

Fig. 5 Tres vistas en aumento de la flor papilionácea mostrando los estambres y el pistilo.

(Tomado de Hanson [1972], dibujos originales de Regina O. Hughes, Agricultural Research Service, USDA).

## ECOLOGIA DE LA ALFALFA

La alfalfa es propia de terrenos calizos y de pH cercano a la neutralidad. Requiere para su cultivo de suelos arenosos y profundos, de subsuelo permeable y con buen drenaje. Resiste a la humedad a condición de que esta no sea durable y bien puede crecer en suelos moderadamente alcalinos (Rather *et al.*, citado en Robles, 1979; Havard-Duclos, 1969).

Cuando se siembra por vez primera, requiere de previa inoculación con bacterias del género *Rhizobium* spp. para favorecer la simbiosis de éstas con las células de su raíz y la formación de nódulos.

Se desarrolla bien en climas templados y fríos, no así en regiones tropicales por su susceptibilidad a plagas y enfermedades y porque no crece bien en suelos ácidos.

Puede sembrarse sola o bien alternarse con otros cultivos, preferentemente con gramíneas (Havard-Duclos, 1969). Es un cultivo perenne, es decir, que puede durar de 3 a 5 años o más en producción siempre y cuando se realicen los manejos adecuados del cultivo.

## EL CULTIVO DE LA ALFALFA.

Para que la alfalfa alcance su máximo desarrollo y a fin de obtener una producción de forraje de buena calidad, se deben considerar una serie de factores que simplemente se mencionarán tales como: la preparación del terreno, fertilización, variedades de semilla adecuadas a la región, densidad de siembra, riegos, insectos polinizadores para la producción de semilla y su cosecha, época de corte del forraje, etcétera.

Como la alfalfa es un cultivo que puede rendir de 3 a 5 años en constante producción, se ha logrado obtener un rendimiento unitario nacional promedio de 56.7 toneladas por hectárea de acuerdo con los datos del Anuario Estadístico de Producción Agrícola para 1985. El cultivo permite hasta 10 cortes por año, de ahí la importancia de que se lleven de manera adecuada las prácticas culturales en los alfalfares. En este punto sobresale el problema de las plagas y enfermedades que menguan significativamente los rendimientos de este cultivo. Sobresalen plagas como el pulgón manchado (*Terioaphis maculata* Buckton), el pulgón verde (*Acyrtosiphon pisum* Harris), el minador de la hoja (*Liriomiza* spp.) y el barrenador de la raíz (*Epicaerus aurifer* Boh); y enfermedades de tipo foliar como el mildiú vellosa (*Peronospora trifoliorum* Dby), la peca (*Pseudopeziza medicaginis* Lib), la mancha de la hoja (*Stemphylium botryosum* Waur) y enfermedades de la raíz como la pudrición texana (*Phymatotrichum omnivorus* Shear (Dug).), la marchitez bacterial (*Corynebacterium insidiosum* McCull) y la pudrición fungal provocada por organismos de los géneros *Fusarium* y *Verticillium* (Castro, 1978).

Otro aspecto importante es la siembra de las semillas de variedades preferentemente certificadas, ya que la certificación establece normas y procedimientos para reducir al mínimo cambios genéticos durante la multiplicación de las semillas de una variedad, además de que se considera mínimo o nulo el contenido de semillas de malezas nocivas (Castillo y Aburto en Robles, 1979) y se garantizan al agricultor ciertas características del cultivo.

Los métodos tradicionales de propagación vegetativa de la alfalfa son mediante rizomas o brotes que nacen de la corona y crecen luego horizontalmente o bien brotes adventicios, que se forman en puntos hinchados de la raíz, llamado también hábito radicular rastrero (Hanson *et al.*, 1978). Sin embargo para propagación comercial estos no resultan ser sistemas lo suficientemente eficientes, sólo se emplean para propagar vegetativamente germoplasma valioso, ya que generalmente se propaga por semilla.

#### GENETICA Y CITOTAXONOMIA.

La alfalfa es una planta algáma, es decir, que el polen que fecunda a los óvulos de una planta proviene de otro individuo dentro de la misma población. Así es que para que pueda llevarse a cabo esta polinización cruzada, actúan como agentes polinizadores las abejas (*Apis melífera*). Es una planta que presenta autoincompatibilidad y es además poliploide (Brauer, 1986), lo cual habla de la enorme heterogeneidad que se observa dentro de las poblaciones de esta forrajera.

La alfalfa común o cultivada *Medicago sativa* L. es autotetraploide, es decir, que cuenta con cuatro juegos cromosómicos ( $n = 8$ ;  $4n = 32$ ) provenientes de la unión de gametos diploides de la misma especie. Esto le ha permitido una amplia distribución y adaptación a diferentes regiones del mundo, que van desde zonas desérticas hasta lugares fríos pasando por regiones templadas, explicándose así la presencia de este cultivo en todos los continentes en la actualidad. Su relación con la alfalfa silvestre diploide ( $2n = 16$ ) es muy estrecha, taxonómicamente a esta se le conoce como *Medicago coerulea*. *M. sativa* tiene flores moradas y sus frutos son legumbres muy espiraladas. Otra especie *M. falcata* conocida como la alfalfa de flor amarilla, es diploide ( $2n = 16$ ) y es endémica de regiones frías, pues crece bien en lugares comprendidos entre  $42^\circ$  y  $62^\circ$  de latitud norte y su hibridización de manera natural con *M. sativa* produjo poblaciones con resistencia a bajas temperaturas y a enfermedades foliares. Los híbridos resultantes son agrupados taxonómicamente bajo la especie denominada *Medicago media* ó *Medicago varia* de flores variegadas. Otras especies sobresalientes de alfalfa son: *M. glutinosa* ( $2n = 32$ ) especie endémica de la región del Cáucaso; *M. glomerata* ( $2n = 16$ ) localizada al norte de África; *M. cancellata* y *M. saxatilis* ( $2n = 48$ ) entre otras que de manera natural se han hibridizado contribuyendo a formar algunas "razas" de alfalfa cultivada (Lesins, 1984).

Los cromosomas de *M. sativa* y especie relacionadas son pequeños, de 3 a 4  $\mu$  de longitud. Por estudios en la etapa de paquiteno ha sido posible realizar el ideograma y las claves de identificación para establecer el número básico de cromosomas  $x = 8$ . (Lesins y Gillies en Hanson, 1972).

#### ORIGEN E HISTORIA DE LA ALFALFA.

La historia de la alfalfa es la historia del forraje cultivado más importante del mundo. Se sabe asimismo, que esta ha sido, dentro de las plantas forrajeras, la primera en haber sido domesticada por el hombre, quien ya la consideró como una planta cultivable de gran valor. Históricamente la alfalfa se ha cultivado desde hace siglos. Su centro de origen comprende varias regiones del Asia Menor: el sur del Cáucaso en la URSS y las tierras altas del Turquestán, lo que hoy en día comprende Irán (Bolton *et al.*, 1972). En esta amplia región crecía de manera silvestre en estado diploide bajo condiciones semidesérticas. Su forma tetraploide cultivada se relaciona más bien con la cría del caballo por el hombre del mundo antiguo (Lesins, 1984). Bolton y colaboradores en 1972, mencionan que las referencias más antiguas sobre la alfalfa se remontan hasta en pueblos como los hititas (1700-1200 a.C) y los Babilonios (700 a.C). Teofrasto narra que fué introducida a Grecia en 490 a.C con la invasión de Persas y Medas que la empleaban como alimento. Consecuentemente los romanos retoman a este cultivo como una herencia más de la civilización griega lográndose su dispersión a toda Italia. El Imperio Romano (25-395 d.C) disemina este cultivo a sus provincias conquistadas como lo que hoy es España, Suiza y el sur de Francia. Del Pozo (1977) menciona que los autores romanos recogen en sus escritos con abundantes detalles la importancia, cultivo y forma de aprovechamiento de la alfalfa. Sin embargo, por otro lado, en la región norte del continente europeo, los pueblos bárbaros introducen material silvestre de zonas cercanas a Siberia que resistía las bajas temperaturas de Alemania y norte de Francia. Con el paso del tiempo ocurre la cruz natural entre las poblaciones de esta alfalfa silvestre *M. falcata* y la alfalfa cultivada *M. sativa* resultando individuos híbridos con características intermedias de ambas especies y que posteriormente los autores la denominaron *M. media* Pers. ó *M. varia* Martyn. Retomando la historia de este cultivo, siglos después, próxima a la caída del Imperio Romano, época de decadencia, hubo un período de aproximadamente 100 años en que el cultivo desapareció de Europa. Una segunda remesa de alfalfa es reintroducida a España particularmente, con la invasión árabe a la Península Ibérica, quienes traían material de Persia y del norte de Africa (Bolton *et al.*, 1972) y quienes la nombraban "alfalfacah" denominación derivada de "aspasti" ó "aspo-asti" que en iraní antiguo significa "el mejor forraje" y que derivaron al nombre de Alfalfa (Hendry, 1923 en Lesins, 1984). Klinkowski citado por Bolton *et al.* en 1972, detalla la dispersión del cultivo a Francia en 1550, a



Bélgica y Holanda en 1565, a Inglaterra en 1650, a Alemania y Austria en 1750 a Suecia en 1770 y a Rusia durante el siglo XVIII, siglo durante el cual se amplía su distribución igualmente en el Nuevo Mundo, Australia y Nueva Zelanda. (Fig. 6).

La introducción de la alfalfa *M. sativa* a América se realizó a través de dos importantes vías: una en el siglo XVI con los colonizadores españoles y portugueses quienes la introdujeron principalmente al Perú y a México; y una segunda partida de alfalfa primordialmente de *M. media* a mediados del siglo XVIII fué introducida por los colonizadores del centro de Europa al llegar a las costas del este de Canadá y noreste de Estados Unidos donde suele haber climas fríos y heladas en época de invierno. Con el paso del tiempo la alfalfa prosperó en su nuevo ambiente americano y se diversificó dentro del mismo continente, de Perú a Chile, Argentina y Uruguay y de México al resto del país y a Texas, Arizona, Nuevo México y California gracias a las diversas migraciones de los misioneros.

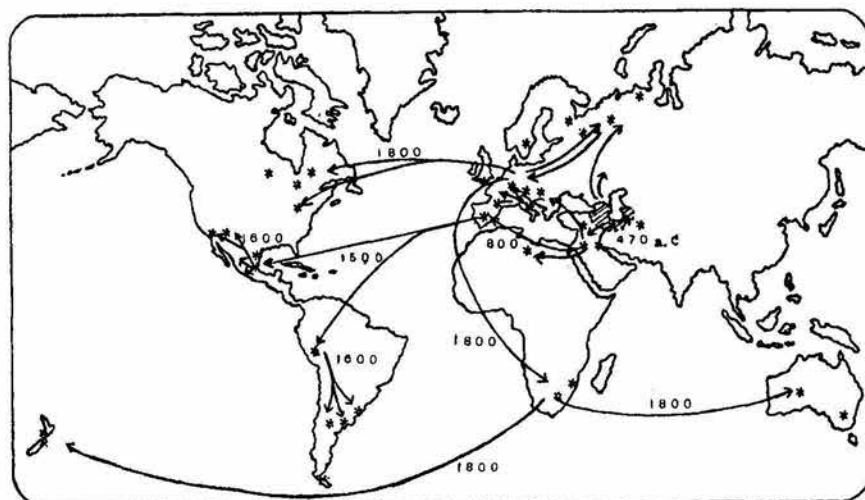


Figura 6. Expansión del cultivo de la alfalfa en el mundo.

⊙ Centro de origen

\* Lugares en donde se ha establecido el cultivo

Adaptado de Del Pozo (1977).

#### LA ALFALFA EN MEXICO.

La alfalfa común *M. sativa* es la especie de mayor importancia como forraje en nuestro país. La fuente de germoplasma en México la constituyen variedades criollas, o ecotipos deri



vados del material introducido de España y que después de cuatro siglos se han adaptado a las diferentes áreas ecológicas del país a través tanto de la selección natural como de la realizada por los agricultores. Estas variedades criollas de *M. sativa* son: Atlixco, Atoyac, Navojoa, Oaxaqueña, San Miguelito, Tanhuato y Zacapu, cuyos nombres los han adquirido del propio lugar de adaptación (Castro, 1978, ver tabla 3).

Tabla 3. Ecotipos o variedades criollas de alfalfa en México y sus áreas de adaptación (Castro, 1978).

Variedades	Lugar de adaptación
Atlixco	Atlixco, Puebla
Atoyac	Atoyac, Jalisco
Navojoa	Navojoa, Sonora
Oaxaqueña	Oaxaca, Oaxaca
San Miguelito	San Miguel Octapan, Guanajuato
Tanhuato	Tanhuato, Michoacán
Zacapu	Zacapu, Michoacán

Ante la necesidad de establecer de manera formal variedades mexicanas de alfalfa, es decir, poblaciones formadas de manera controlada y dirigida por el hombre con características bien definidas y poco alterables a lo largo del tiempo (Del Pozo, 1977) se han venido realizando una serie de trabajos que comenzaron hace más de tres décadas por parte de la Oficina de Estudios Especiales de la Secretaría de Agricultura y Ganadería y posteriormente por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP antes INIA) de la Sra de Agricultura y Recursos Hidráulicos, para evaluar un conjunto de características agronómicas como la determinación de variedades más rendidoras para cada región lechera del país, épocas y métodos de siembra más adecuados, densidad de siembra de la semilla, estado fenológico de la planta óptimo para el corte, producción de forraje, entre otras características tanto en material criollo como en el introducido así como el inicio de Programas de Mejoramiento Genético y la obtención de variedades mejoradas. Los primeros resultados de dichos estudios arrojaron datos muy interesantes, entre ellos, la identificación y recolección de material criollo formado por el material comúnmente conocido como las variedades Oaxaca, Atlixco, Atoyac y San Miguelito y la obtención de las variedades sintéticas Valdura, Hojaseo y Tanverde (Buller y Valdivieso, 1957), resistentes a enfermedades foliares y de alto rendimiento. En otros centros de investigación del país se realizaron evaluaciones similares con diversos resultados, si se considera que se trabajó en diferentes áreas ecológicas donde los resultados de las mejores variedades fueron distintos entre una y otra (Tabla 4), por ello se vió la necesidad de introducir material del extranjero que apoyara los programas de Mejoramiento Genético. Sin embar-

go, como reporta Buller (1958), los altos insumos que requieren cada uno de estos programas constituyen una limitación, dado que se requieren lapsos de tiempo de por lo menos siete años para obtener resultados reproducibles con varias fases de cruza y retrocruza de genotipos así como la evaluación y preservación del material obtenido.

Tabla 4. Variedades recomendadas por los Centros de Investigación del INIA en sus áreas de influencia (Robles, 1979).

Centro	Variedades
Centro de Investigaciones Agrícolas del Norte (C.I.A.N)	Moapa, Africana
Centro de Investigaciones Agrícolas del Noroeste (C.I.A.N.E)	Atoyac, Moapa, AS-13, Cody, Lahontan
Centro de Investigaciones Agrícolas de El Bajío (C.I.A.B)	Tanverde, Tanhuato, Moapa
Centro de Investigaciones Básicas (C.I.B)	Tanhuato, Atlixco, Tanverde, Oaxaca

En la actualidad todos estos esfuerzos se ven coronados con la obtención de las variedades de alfalfa mexicanas Celaya I (Castro, 1978), INIA 76, Mixteca 76, Puebla 76 y Bajío 76 (Aguirre, 1976), de las cuales estas cuatro últimas han mostrado tener una vida larga, buena recuperación después del corte, tolerancia a enfermedades y mayor producción promedio de forraje verde, superando a las variedades introducidas Valenciana, Moapa y San Joaquín (Magallanes, 1986) muy utilizadas en los Valles Altos, El Bajío y la región centro y norte del país. (Tabla 5).

Tabla 5. Variedades de alfalfa *M. sativa* certificadas por el INIA, su ecotipo correspondiente y estado de procedencia. (Castro Acero comunicación personal).

Variedad mexicana	Variedad criolla	Estado
Tanverde	Tanhuato	Michoacán
Puebla 76	Atlixco	Puebla
INIA 76	Tanhuato	Michoacán
Bajío 76	San Miguelito	Guanajuato
Mixteca 76	Oaxaqueña	Oaxaca

Sin embargo persiste el hecho de que aún hace falta producir semillas certificadas que satisfagan la demanda nacional de semilla de buena calidad, por lo que se ha tenido que importar gruesos de semilla del extranjero. La tabla 6 engloba a aquellas variedades introducidas que más ampliamente se cultivan en nuestro país. En la actualidad el INIFAP cuenta con un modesto banco de germoplasma para investigación, por lo que se requiere de metodologías apropiadas que permitan la conservación y pre-

servación de este valioso material.

Tabla 6. Variedades introducidas de alfalfa que se cultivan ampliamente en México (Datos tomados del Anuario Estadístico de Producción Agrícola para 1985 de SARH-DGEA).

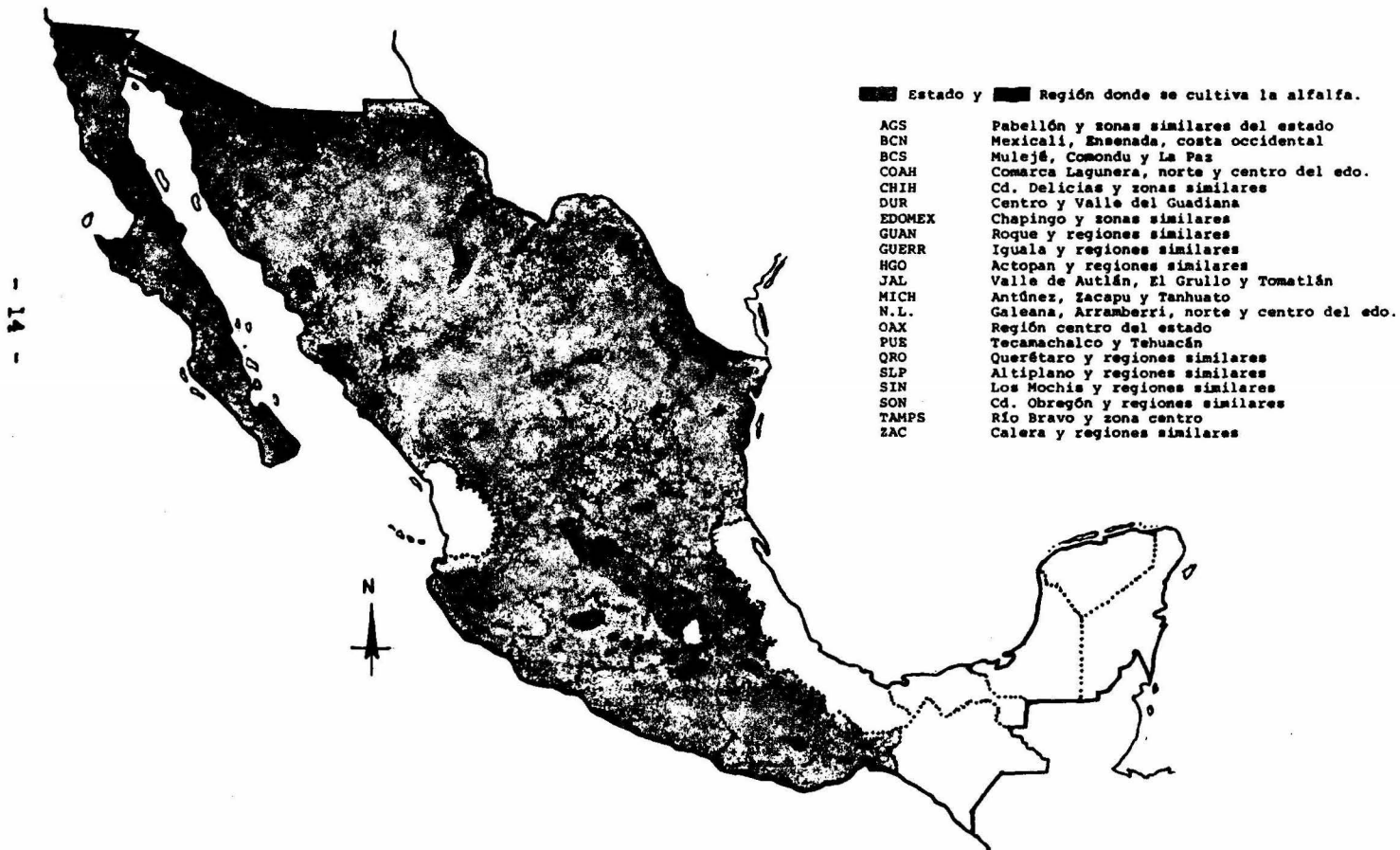
AF-11	EXA-3050	NK-819
Africana	EXA-3060	Ranger
Aragón	EXP-i-75	Saltón
Arizona Chilena	Hayden	San Joaquín II
AS-13	Hunter River	Sonora
Astro	Kodiak	Sonora 70
Caliente	Matador	Valencia
Criolla	Mesa Sirsa	Velluda Peruana
El Camino	Moapa	XL-58
El Unico	Moapa 69	
EXA-3040	MS-8	

#### DISTRIBUCION Y PRODUCCION EN MEXICO

Con excepción de las zonas tropicales, la alfalfa se encuentra ampliamente distribuida en el país, sobretodo en aquellas regiones superiores a los 500 a 600 msnm como límite más bajo para su mejor desarrollo. La excepción aparece en Baja California y Sonora donde a nivel del mar el cultivo prospera gracias al clima continental con el que cuentan estas zonas aún en la costa. La mejor faja alfalfera de México se localiza en la región de El Bajío y el Valle de México, aunque ha prosperado bien en diversas zonas del país dentro de un total de 21 estados de la República Mexicana tal y como se ilustra en la figura 6. En cambio en la vertiente del Golfo de México, donde las tierras son bajas y húmedas este cultivo no prospera bien (Robles, 1979).

En los últimos cinco años la superficie sembrada de alfalfa ha sido de aproximadamente 251 mil hectáreas, con una producción de forraje verde de 13.7 millones de toneladas en total de acuerdo con los datos reportados por SARH-DGEA para 1985, que aún así resultan insuficientes para cubrir la demanda interna de este forraje, problema que se agrava día a día con el establecimiento de nuevas cuencas lecheras y en cuanto a que su consumo se extiende a ganado caballar, caprino, porcino y a aves de corral.

Fig. 3 DISTRIBUCION GENERAL DE LA ALFALFA EN MEXICO



## EMBRIOGENESIS SOMATICA *In vitro*

[Un embrión se define como el estado inicial del desarrollo de una planta (Wardlaw 1955, 1968 en Tisserat *et al.*, 1979) que morfológicamente se caracteriza por tener dos polos meristemáticos opuestos: el apical que dará lugar a los brotes de la planta y el radicular que originará la raíz. El embrión cigótico surge a partir de una serie de divisiones mitóticas que sufre el cigoto, el cual experimenta una serie de estadios de desarrollo específicos que estructuralmente se conocen como estados globular, corazón y torpedo (Sharp *et al.*, 1980).]

De manera natural en muchas especies vegetales puede observarse con relativa facilidad la formación de embriones asexuales o no cigóticos, fenómeno denominado de igual manera apomixis (Nygren 1954, Stebbins 1941 en Tisserat *et al.*, 1979), poliembrionía (Webber 1940 en Tisserat., 1979) o embriogénesis adventiva (Esan 1973, Schoreder 1968 en Tisserat *et al.*, 1979). Este proceso implica la formación de embriones a partir de células somáticas o células gaméticas que no son producto de una fertilización y cuya morfología y patrón de desarrollo es muy similar al que se observa en los embriones sexuales. En la naturaleza se presentan diversos tipos de embriogénesis asexual conocidos como androgénesis o embriones originados a partir de las microsporas; partenogénesis o embriones que se originan a partir del óvulo o de la oospora; ginogénesis o embriones originados de oosporas fertilizadas de manera parcial y apometría en la que los embriones se desarrollan a partir de las sinérgidas o antipodales (Sharp *et al.*, 1980), células incluidas en el saco embrionario de la flor. [Tisserat *et al.* (1979) enlistan un total de 59 familias de angiospermas con 138 géneros y 239 especies, en los que se registra el fenómeno de embriogénesis asexual de manera natural.]

[La embriogénesis asexual o embriogénesis somática *in vitro* fué reportada por vez primera por Steward, Mapes y Mears (1958, en Tisserat *et al.*, 1979) en cultivos en suspensión y por Reinert (1959, en Tisserat *et al.*, 1979) en cultivos de callo en medio sólido en zanahoria *Daucus carota*.]

A partir de entonces los trabajos sobre embriogénesis somática progresaron tanto en los sistemas para zanahoria así como para otras especies de plantas, algunas de las cuales pertenecen a familias de plantas como Gramíneae, Rutaceae, Solanáceae, y Umbelliferae en las cuales la embriogénesis adventiva *in vivo* se pone de manifiesto de manera espontánea y en aquellas otras familias como en Araliaceae, Brassicaceae, Caricaceae y Vitaceae que no exhiben este fenómeno de manera natural.

[El proceso de inducir la regeneración de plantas a través del cultivo de tejidos *in vitro* puede realizarse de manera indirecta con la producción de una masa de células desorganizadas]

das (comúnmente conocida como callo) a partir del inóculo inicial; o bien directamente, con la formación de los embriones somáticos a partir de los segmentos de tejido vegetal en cultivo. Sharp *et al.*, (1980), Evans *et al.* (1981), Ammirato (1984) y Williams y Maheswaran (1986) mencionan una hipótesis para tratar de explicar estos dos procesos de desarrollo embriogénico *in vitro*. Enuncian que el proceso de embriogénesis directo procede a partir de células que ya están determinadas hacia un desarrollo embriogénico (PEDC por sus siglas en inglés), y que sólo requieren de condiciones favorables que les permitan continuar la división celular y su expresión embriogénica. Por el contrario la embriogénesis indirecta requiere de una redeterminación de células diferenciadas, proliferación de callo y desarrollo hacia un estado embriogénicamente determinado. Para estas células que se inducen hacia una determinación embriogénica (IEDC) es necesaria la presencia de hormonas exógenas o reguladores del crecimiento. Sharp *et al.* (1980), concluyen que es asimismo muy importante el estado fisiológico de las células en cultivo para lograr la expresión de la embriogénesis somática. La importancia de los reguladores del crecimiento radica tal vez en su función como agentes "permissivos" de la expresión de este patrón de desarrollo intrínsecamente determinado.

El proceso embriogénico indirecto implica entonces, el establecimiento de callos en división activa obtenidos a partir de un tejido específico. Para ello se distinguen dos eventos importantes: la primera fase de inducción hacia la citodiferenciación por parte de las células embriogénicas mediante la manipulación de la relación auxina/citocinina; y una segunda fase, donde se continua la secuencia de desarrollo de tales células proembrionicas (Kohlenbach, 1978 en Dodds y Roberts, 1982) y se ponen de manifiesto los embriones somáticos.

## FACTORES QUE CONTROLAN LA EMBRIOGENESIS.

### A. Medio de cultivo.

[Para el desarrollo de la embriogénesis somática *in vitro* se han empleado diversas formulaciones nutricionales] como menciona Ammirato en 1984, desde medios simples como el de White (1963) hasta aquellos más concentrados como el B5 de Gamborg *et al.* (1968), incluyendo a aquellos conocidos como SH (Schenk y Hildebrandt, 1972), MS (Murashige y Skoog, 1962) de los cuales estos tres últimos se consideran como medios de altas concentraciones en sales inorgánicas. Evans *et al.* en 1981 consideran que el 70% de los cultivos se han realizado en el medio MS o bien en un MS modificado. Otros medios de cultivo generalmente empleados para el cultivo de leguminosas han sido: LS (Linsmaier y Skoog, 1965), Blaydes (Blaydes, 1966) y PC-L2 (Phillips y Collins, 1970) como menciona Conger (1980).



Las bases para todos los medios de cultivo son una mezcla de sales minerales, combinando elementos esenciales macronutrientes, micronutrientes, junto con una fuente de energía, comúnmente es empleada la sacarosa (Yeoman y McLeod, 1977 en Conger, 1980) y varios constituyentes orgánicos como vitaminas y reguladores del crecimiento (Conger, 1980).

Un factor importante para los cultivos de células vía embriogénesis somática es la fuente de nitrógeno, suplementada bajo la forma de nitratos, ion amonio o de complejos orgánicos nitrogenados como los aminoácidos (Dodds y Roberts, 1982; Stuart y Strickland, 1984a, b y Stuart *et al.*, 1985). El suplemento de la fuente de nitrógeno tanto en forma de sal inorgánica oxidada o en su forma ionizada o reducida, es necesaria tanto en el medio de inducción como en el medio de regeneración. De hecho, el proceso de inducción involucra la interacción del ion amonio (forma reducida) con los reguladores del crecimiento. La fuente de nitrógeno total es determinante en la etapa de desarrollo de los embriones somáticos. Walker y Sato (1981), enuncian que el ion amonio suplementado de manera exógena tiene un efecto tanto cuantitativo como cualitativo en el patrón de morfogénesis de alfalfa *in vitro*. Asimismo, resaltan que la embriogénesis no se da en ausencia del ion amonio o del nitrato, siendo ambas fuentes igualmente necesarias. La concentración específica de uno u otro tipo de fuente nitrogenada varía de acuerdo al tipo de planta (genotipo) sometido a cultivo embriogénico, debido a las particulares actividades de enzimas reductasas que hacen disponibles los compuestos nitrogenados a las plantas, aunque puede generalizarse que el contenido total de nitrógeno requerido para cultivos embriogénicos tanto en el medio de inducción como en el de regeneración debe ser de 25mM a 100mM.

Bajo la forma de complejos orgánicos también se han empleado como fuente de nitrógeno en los medios de cultivo: caseína hidrolizada (Ammirato y Steward, 1971 en Ammirato, 1984); una mezcla de aminoácidos (Kato y Takeuchi, 1966 en Ammirato, 1984); aminoácidos en forma individual (Wheterell y Dougall, 1976 en Ammirato 1984; Stuart y Strickland 1984a; Skokut *et al.*; 1985), de donde se resalta el papel esencial que juegan la L-glutamina, L-asparagina, L-prolina y L-alanina en la calidad y frecuencia de los embriones obtenidos durante la fase de desarrollo y, finalmente extracto de levadura (Saunders y Bingham, 1972, 1975).

Otros elementos minerales importantes para la embriogénesis somática son: el ion potasio que resulta esencial para el sistema de embriogénesis de zanahoria (Reinert *et al.*, 1967 en Ammirato, 1984) especialmente cuando el suplemento de nitrógeno es inadecuado (Tisserat *et al.*, 1979); el calcio, que en altas concentraciones inhibe el desarrollo de los embriones somáticos de zanahoria (Tazawa y Reinert, 1969 en Tisserat *et al.*, 1979), aunque esto no es aplicable a todos los sistemas de embriogénesis; y el fierro que debe suplementarse en forma quelada como

Fe-EDTA, ya que su ausencia impide que los embriones en estado globular pasen al estado de corazón. Esto ha sido reportado por Nitsch (1969), Haberle-Bors (1980) y Havranek y Vagera (1979) citados por Ammirato (1984) para cultivos de tabaco, belladona y zanahoria respectivamente.

## B. Reguladores del crecimiento.

Sharp *et al.* (1980) mencionan que las fitohormonas o reguladores naturales de las plantas, pueden actuar como agentes activadores de células competentes a responder hacia vías específicas de morfogénesis, y que de acuerdo a su concentración relativa pueden suprimir, permitir o modificar condiciones de citodiferenciación específica.

Para los sistemas de embriogénesis asexual indirecta en cultivo, donde la producción de embriones está mediada por la formación de callo, se ha demostrado que los reguladores del crecimiento, especialmente las auxinas o las substancias que actúan de manera similar a las auxinas en combinación con las citocininas y una adecuada concentración de compuesto nitrogenados en el medio de cultivo, son esenciales para la inducción de la embriogénesis (Fujimura y Komamine en Ammirato, 1984). Sin embargo, un alto nivel de auxina inhibe el desarrollo de los embriones somáticos. Al respecto, Bingham *et al.* (1975) concluyen que, de entrada, el nivel óptimo de hormonas se desconoce, aunque se ha observado que elevados niveles de la auxina sintética ácido 2,4-diclorofenoxiacético ó 2,4-D promueven la embriogénesis durante el estado preglobular en los cultivos y en cambio, que el mantenimiento de una alta concentración de este agente inductor, inhibe el ulterior desarrollo de los embriones o en ocasiones provoca que los embriones globulares re viertan a formar callo nuevamente.

De acuerdo con Evans *et al.* (1981) el 2,4-D ha sido la auxina comúnmente más empleada, pero también se han manejado otras auxinas como el ácido  $\alpha$ -naftalenacético (ANA), el ácido indolacético (AIA) que es una auxina natural y en menor escala el ácido 2-benzotiazolacético (BTOA), el ácido p-clorofenoxiacético (p-CPA) y el picloram. Bingham *et al.* en cultivos de alfalfa observaron que el papel del ANA y del AIA no era necesario en la inducción a embriogénesis, más bien permiten la formación del callo, pero si este no es sometido al 2,4-D no se observará embriogénesis. El rango de concentración de las auxinas varía enormemente. Kao y Michayluk (1981) en los sistemas para alfalfa, establecen que la concentración óptima de los reguladores del crecimiento resultan ser específicos de acuerdo al genotipo del material empleado, por lo que debe ser determinado empíricamente.

En relación a las citocininas, Fujimura y Komamine (1980) citados por Ammirato (1984), sostienen que estos compuestos son



importantes para promover la maduración de los embriones y especialmente el desarrollo de los cotiledones (Ammirato y Komamine, 1971 en Ammirato, 1984) } por lo que pueden emplearse tanto en el medio de inducción como en el medio de regeneración. En ocasiones, asimismo, se ha reportado que las citocininas se requieren para el desarrollo de los embriones y para su conversión en plantas (Kavatherkar *et al.*, 1978 en Ammirato, 1984). La citocinina más empleada es la cinetina con un rango efectivo de concentración de  $0.5\mu\text{M}$  a  $5.0\mu\text{M}$  (Ammirato, 1984). Otros tipos de citocininas que se han empleado son la bencilaminopurina (BAP) y la zeatina, esta última estimula la embriogénesis en cultivos de zanahoria específicamente (Fujimura y Komamine, 1975 en Ammirato, 1984).

Otro tipo de reguladores generalmente poco empleado, han sido las giberelinas. Según documentan Nitsch y Nitsch en 1969 (en Sharp *et al.*, 1980), la giberelina en ocasiones influye en el desarrollo del embrión somático, pero no influye en la frecuencia de embriogénesis. Ammirato (1984) menciona que estos compuestos también estimulan el enraizamiento y el subsecuente desarrollo de las plántulas obtenidas de los cultivos embriogénicos en especies de plantas como *Zea mays* (Lu *et al.*, 1982, en Ammirato 1984) y *Citrus sinensis* (Kochba *et al.*, 1974 en Ammirato, 1984), aunque estos resultados no son una regla aplicable a todas las especies.

### C. Fuentes de inóculo.

Según Kohlenbach (1978 en Dodds y Roberts, 1982) la obtención de embriones puede ser a través de tres fuentes de células diploides:

- (a) de células vegetativas de plantas maduras;
  - (b) de tejido reproductivo diferente al cigoto;
  - (c) y de hipocotilos y cotiledones de plántulas,
- aunque también suelen emplearse los tejidos de estructuras reproductivas de la planta en estado inmaduro como ovarios y anteras.

Ammirato (1984) concluye que tejidos embrionarios, meristemáticos y reproductivos tienen mayor potencialidad embriogénica en los cultivos, aunque existen plantas como en zanahoria *Daucus carota*, en donde prácticamente cualquier segmento cultivado produce embriones somáticos, en otras como en *Hedera helix* (Banks 1979, en Ammirato, 1984) solo el material procedente de tejidos adultos de la planta es capaz de producir embriones, por lo que se concluye que tampoco en este aspecto cabe hacer generalizaciones.

En algunas especies, diferencias en los genotipos empleados muestran potencialidades diferentes en cuanto a respuesta embriogénica, como es el caso de la alfalfa *Medicago sativa*

(Kao y Michayluk, 1981), *Trifolium pratense* (Keyes et al., 1980 en Ammirato, 1984) y *Daucus carota* (Steward et al., en Ammirato, 1984).

El nivel de ploidía presente en un mismo tipo de planta parece no afectar a aquellas células que ya están programadas a formar embriones somáticos. Sin embargo, cambios en el nivel de ploidía en los cultivos ya establecidos, sí pueden modificar el potencial embriogénico, siendo esta la razón de que este potencial de regeneración *in vitro* disminuya gradualmente en los sucesivos subcultivos, como reportan Atanassov y Brown (1984).

Ammirato (1984) enuncia asimismo, que el estado fisiológico de la planta a partir de la cual se toma el inóculo es un factor extremadamente importante en el éxito de la respuesta embriogénica.

#### D. Condiciones ambientales.

En este aspecto tampoco es posible generalizar en cuanto a las condiciones de luz o de temperatura que engloben a todos los sistemas de regeneración de plantas por embriogénesis somática. Ammirato (1984) menciona que la embriogénesis somática se ha observado bajo una variedad de regímenes de luz/obscuridad así como diferencias en cuanto a la calidad de luz. En lo referente a la temperatura, este mismo autor enuncia que existen pocos trabajos sobre el efecto de este factor en los cultivos.

#### E. Factores que controlan la regeneración de alfalfa.

##### - GENOTIPO.

Se ha corroborado ampliamente que la regeneración de alfalfa está plenamente influenciada por el genotipo del material con el que se trabaja. Varios estudios se han avocado decididamente a realizar un sondeo de material embriogénico entre un gran número de variedades o cultivares de alfalfa. Cabe mencionar que, como mencionan frecuentemente Kao y Michayluk (1980, 1981), la alfalfa es una planta de polinización abierta, es además una especie con poblaciones (variedades) muy heterogéneas, por lo que de entrada ya se cuenta con una variabilidad inherente en el germoplasma y esto debe considerarse para cualquier trabajo que se realice con esta planta. Saunders y Bingham (1972, 1975) concluyen que la obtención de brotes en los cultivos de alfalfa está condicionada por la interacción del genotipo y los medio de cultivo de inducción y regeneración.

##### - LA FUENTE DE NITROGENO EN LOS CULTIVOS.

Previamente se mencionó la importancia de los compuestos ni-

trogenados para los cultivos embriogénicos. Para los sistemas de alfalfa se corroboran estos puntos en los trabajos de Walker y Sato (1981) donde también mencionan que los niveles óptimos para la producción de embriones es de 25mM a 100mM de nitrógeno reducido bajo la forma de ion amonio, ya que a niveles inferiores de 12.5mM sólo se observa la formación de raíces. Walker *et al.* (1978, 1979) concluyen que la fuente de nitrógeno reducido en el medio de regeneración de la embriogénesis es fundamental para tener éxito en la obtención de embriones somáticos. Stuart y Strickland (1984a, b) complementan esta información al adicionar aminoácidos al medio de regeneración como fuente de nitrógeno reducido en combinación con el ion amonio, observando que la combinación de la L-prolina y  $\text{NH}_4^+$  o la L-glutamina sola, estimulan favorablemente la embriogénesis en los cultivos de la línea RA 3 (Regen S) de *M. sativa*.

- CALIDAD Y CANTIDAD DE REGULADORES DEL CRECIMIENTO.

El 2,4-D es empleado como agente "inductor" de la embriogénesis y como tal debe incluirse en el medio inicial a altas concentraciones. Entre los trabajos con alfalfa se emplean niveles de este regulador que varían desde 1mg/l (4.5 $\mu\text{M}$ ) (Saunders y Bingham, 1975) hasta 22mg/l (100 $\mu\text{M}$ ) (Novak y Konecna, 1982), pero varios trabajos lo adicionan a una concentración de 2mg/l (9.0  $\mu\text{M}$ ) (Meijer y Brown, 1987). Algunos autores incluyen en sus medios de cultivo al ANA a una concentración de 5mg/l, es decir, a 25 $\mu\text{M}$  (Skokut *et al.*, 1985) y a la cinetina desde 0.18 mg/l (1  $\mu\text{M}$ ) (Brown y Atanassov, 1985), hasta 4.6 mg/l, o bien, 25  $\mu\text{M}$  (Skokut *et al.*, 1985). De acuerdo a lo revisado en la literatura, no existen niveles cuantitativos específicos y sólo se han obtenido algunos valores óptimos experimentales que van de acuerdo al genotipo.

- CULTIVOS SOMETIDOS A UNA SECUENCIA DE DOS PASOS.

El primero implica someter al inóculo a alta concentración de la auxina 2,4-D en el medio de cultivo, esta fase se considera como la fase de inducción de la embriogénesis. El segundo paso o fase de desarrollo y regeneración de los embriones somáticos, implica transferir al callo formado a partir del inóculo inicial, a un medio de cultivo sin 2,4-D y en ocasiones sin ningún otro regulador del crecimiento. Existen pequeñas variaciones a este protocolo donde se incluyen hasta tres fases (Atanassov y Brown, 1984; dos Santos *et al.*, 1980; Walker y Sato, 1981): la de inducción, una segunda donde se incluye al ANA, cinetina y/o BAP para mejorar la calidad de los embriones y la última sin hormonas exógenas para la regeneración de los embriones somáticos.

F. Perspectivas de la embriogénesis somática *in vitro*.

Aunque esta metodología no es aún aplicable a todas las especies vegetales con igual grado de éxito, la embriogénesis so-

mática experimental ha sido reportada en tejidos cultivados de más de 30 familias de plantas como hacen una lista Tisserat *et al.* (1979) y Ammirato (1984).

El interés práctico que ofrece esta metodología de micro-propagación es que haciendo uso de genotipos deseables estos se pueden multiplicar casi ilimitadamente con relativa facilidad (Villalobos, 1985). Asimismo, Ammirato (1987) menciona que mediante la embriogénesis somática es posible:

- obtener un gran número de embriones y consecuentemente de plantas;
- la presencia de un meristemo apical y un meristemo radicular en una misma unidad por lo que no se requiere de subcultivos a fin de obtener brotes por un lado y luego tener que inducir el enraizamiento de éstos, sino que a través de una sola vía de morfogénesis se pueden obtener plantas completas;
- la facilidad de manejo de los embriones en cultivos en suspensión por lo que es posible obtenerlos individualmente;
- la posibilidad a futuro de lograr inducir en estos embriones dormancia y así preservarlos por períodos de tiempo más prolongados;
- darles a estos embriones cubiertas artificiales de protección a manera de "semillas artificiales";
- una vez establecida la metodología, es decir, luego de obtener embriones en alta cantidad y calidad, realizar experimentos a nivel molecular y bioquímico para tratar de dilucidar como ocurren los procesos de inducción y desarrollo;
- la obtención de plantas con características sobresalientes: como la resistencia a plagas y enfermedades o a condiciones de sequía, a través de metodologías como la variación somaclonal y por último,
- la hibridización *in vitro* de genotipos deseables.)

#### SISTEMAS DE REGENERACION *In vitro* DE ALFALFA.

Dentro de los sistemas de regeneración *in vitro* de alfalfa los primeros reportes corresponden a Saunders y Bingham en 1972 y 1975, quienes obtuvieron plantas a partir de cultivos de callo. Desde entonces los trabajos sobre regeneración de plantas de alfalfa a partir de células y tejidos de cultivos asépticos han progresado rápidamente. Las líneas de trabajo de alfalfa incluyen tanto organogénesis como embriogénesis somática en trabajos como: la obtención de estructuras denominadas como brotes y embrioides (Saunders y Bingham 1972, 1975; Walker *et al.*, 1978, 1979; Reisch y Bingham 1980 y Stavarek *et al.*, 1980); cultivos en suspensión (McCoy y Bingham 1977; Walker y Sato 1981; Kao y Michayluk 1981); cultivos de protoplastos (Kao y Michayluk 1981; dos Santos *et al.*, 1980; Johnson *et al.*, 1981; Arcioni *et al.*, 1982; Xu *et al.*, 1982; Lu *et al.*, 1983; Pezotti *et al.*, 1984; Dijak y Brown 1987a, 1987b) y embriogénesis somática (dos Santos *et al.*, 1980, 1983; Walker y Sato 1981; Novak y Konecna 1982;

Mesentsev y Karelina, 1982; Luppotto 1983; Stuart y Strickland 1984a, 1984b; Skokut *et al.*, 1985; Stuart *et al.*, 1985; Meijer y Brown 1985, 1987a, 1987b; Brown y Atanassov, 1985; Nagarajan *et al.*, 1986) y otros trabajos como hibridización interespecífica, inducción a tolerancia al frío, resistencia a patógenos y enfermedades y variación somaclonal.

Sin embargo, la tecnología con que se cuenta en la actualidad no permite aún establecer un sistema general de regeneración del total de germoplasma para alfalfa como postulan McCoy y Walker (1984).

Saunders y Bingham (1972) mencionan la posibilidad de que exista una marcada influencia del genotipo sobre la capacidad de regeneración de los cultivos *in vitro*, lo cual posteriormente se corrobora en los reportes de dos Santos *et al.* (1980), Brown *et al.* (1985) y Nagarajan *et al.* (1986) quienes finalmente concluyen que la carga genética condiciona el tipo de respuesta morfogénica que manifiestan los cultivos. De hecho, la falta de este potencial de regeneración que lleva implícito el genotipo constituye la primera gran limitación en la obtención de embriones somáticos de alfalfa.

En el trabajo de Bingham, Hurley, Kaatz y Saunders (1975), se detalla la selección de germoplasma a partir de nueve variedades comerciales de las cuales sólo un pequeño número de genotipos posee capacidad embriogénica: Saranac y DuPuits, el resto sólo mostró tener de 17% a 36% de regeneración. Para mejorar estos porcentajes, estos autores en este mismo trabajo, identificaron cinco clones fértiles: 4 de Saranac y 1 de DuPuits sobre los que practicaron dos ciclos de selección recurrente, incrementando así la frecuencia de regeneración de un 12% a un 67% y establecieron finalmente el cultivar Regen S, material tetraploide y de flores color morado. Walker *et al.* (1978) mejoraron este porcentaje de 67% hasta 100% con el clon RA 3 derivado de Regen S, haciendo la observación en los diferentes tipos de respuesta que mostraron los 14 clones originados de una misma variedad. Con los trabajos de Bingham *et al.* (1975) se demuestra asimismo, que esta capacidad de regeneración es perfectamente heredable aunque un gran volumen de germoplasma de alfalfa regenera a plantas en los cultivos en muy baja proporción.

Un trabajo similar realizaron McCoy y Bingham en 1977 al seleccionar un clon diploide con capacidad regenerativa: HG 2. Posteriormente Reisch y Bingham (1980) en un trabajo donde examinan la herencia cualitativa de la regeneración *in vitro* de una línea diploide de alfalfa, sostienen la hipótesis de que la diferenciación morfogénica a partir de cultivos de callo está controlada por dos genes dominantes. Sin embargo, esto no resulta ser concluyente. En este mismo trabajo se observa que la obtención de material con alto porcentaje de regeneración morfogénica no fué tan alto como se esperaba, probablemente porque estos genotipos "altamente regeneradores" tienen baja supervi-



vencia y exista una pobre fertilidad entre sus semillas.

Saunders y Bingham (1972) concluyen que el efecto que impone el genotipo de manera definitiva sobre la morfogénesis de los cultivos, hace imperativo el probar amplios rangos de germoplasma.

Phillips en 1983, menciona que trabajó con alrededor de 300 genotipos de alfalfa derivados de tres poblaciones genéticas diferentes, especialmente material adaptado a las áreas ecológicas del suroeste de Estados Unidos, y de donde la mejor respuesta de regeneración que obtuvo fue de 11%.

Mitten, Sato y Skokut en 1984, evaluaron 35 cultivares de las especies *Medicago falcata*, *Medicago media* y *Medicago sativa*, en representación de un amplio espectro de cultivares de alfalfa. Ellos reportan la formación de embriones y en ocasiones observan estructuras verdes semiorganizadas que califican como cultivos de un bajo potencial de regeneración. Los cultivares con altos porcentajes de regeneración son: Ladak 82%, Norseman 46%, Nomad 39% y Turkestán con 38%. Tales cultivares como indican McCoy y Walker (1984) son originarios de una región turco-iraní, región geográfica considerada como el sitio de origen de varias especies de alfalfa. La mayor parte del resto de las variedades tuvieron una capacidad de regeneración desde 11% a 25%. Más adelante se discute que la frecuencia de regeneración de Ladak pueda estar relacionada con su fácil predisposición de desarrollar brotes adventicios de la raíz de manera natural.

Atanassov y Brown en 1984, reportaron cultivos en suspensión y regeneración de protoplastos y emplearon trece cultivares, tres de los cuales: Rangelander, Regen S y Rambler formaron embriones en un 100%, 67% y 53% respectivamente; el resto de las variedades solamente formaron embriones somáticos entre un 0% a 20% bajo el mismo tratamiento de medios de cultivo y reguladores del crecimiento.

Además de esta serie de antecedentes, Brown y Atanassov en 1985, deciden experimentar con un mayor número de cultivares la capacidad de regeneración de plantas *in vitro* para luego seleccionar a aquellos genotipos altamente regeneradores e interrelacionar la influencia de la fuente de germoplasma de los cultivares con respecto a su respuesta morfogenética en los cultivos. Para tal efecto, se sometieron a prueba 76 cultivares que se cultivan ampliamente en Canadá, de los cuales el 34% mostraron capacidad de formar embriones somáticos. A pesar de que un amplio número de variedades mostraron respuesta regeneradora nula bajo cultivo, los autores enuncian que estos resultados no son concluyentes como única forma de determinar la habilidad de la regeneración *in vitro*, de hecho, consideran que el esquema de cultivo que emplearon no es el más conveniente para líneas de regeneración pobre donde se obtuvieron porcentajes de regeneración

menores que los previamente reportados por Bingham *et al.* en 1975 y Phillips en 1983 entre otros. Al realizar un estudio más profundo acerca del origen genético de los cultivares que emplearon, delimitaron finalmente nueve fuentes de germoplasma que forma parte del complejo *M. falcata*/*M. sativa*. Estas fuentes de germoplasma fluctúan en diferentes rangos en cuanto a las cantidades relativas de aportación entre *M. sativa* y *M. falcata*. Indican que las diferencias o variaciones entre ambas van de acuerdo a las presiones de selección natural a las cuales estuvieron sometidas cada una de las poblaciones (ecotipos). Posteriormente hicieron una selección de 25 cultivares que tuvieran el mayor porcentaje de formación de embriones y determinaron qué tanta influencia existe de cada una de las nueve fuentes de germoplasma en el genotipo de cada uno de dichos cultivares. Percibieron que dentro de las primeras once variedades altamente regeneradoras, estas poseen mayor aportación de linaje genético de Ladak (que es una variedad formada principalmente por cepas de *M. falcata*) y de *M. falcata*. La única excepción fue el cultivar Regen S, seleccionado por Bingham y colaboradores en 1975, con una respuesta embriogénica alta (67-100%) y cuyo linaje genético posee 87% de Flemish (típicamente de *M. sativa*), cuando por el contrario los cultivares DuPuits y Saranac, material parental de Regen S, ambos de *M. sativa*, bajo el mismo tratamiento, mostraron valores bajos de regeneración entre 10% y 14%. Resaltan por otro lado, el hecho de que aquellos cultivares con mayor contribución Ladak y *M. falcata*, fenotípicamente la planta muestra el desarrollo lateral de la raíz en la que se forman brotes adventicios a ciertos intervalos (hábito radicular rastrero). Aunque existe poca información sobre este fenómeno, parece ser que está controlado por varios genes, específicamente de *M. falcata*. Bingham y colaboradores en 1975, mencionan al respecto, que dos de sus cultivares que mostraron mayor porcentaje de respuesta de regeneración en los cultivos del material que probaron, son plantas que presentan de manera natural el hábito radicular rastrero: Roamer 36% y Rambler 35% de regeneración. En este mismo trabajo de Brown y Atanassov (1985), se menciona que en base a sus observaciones, no existe una relación aparente en la cantidad de callo producido como un pr-requisito para obtener una alta respuesta embriogénica, aunque en general los cultivos embriogénicos muestran al menos poco callo.

En relación a los protocolos de cultivo (medios de cultivo/reguladores del crecimiento) empleados por Brown y Atanassov (1985), observan que no son los adecuados para variedades de baja regeneración, en cambio, para las variedades de alta regeneración aumentó notablemente la cantidad de embriones somáticos obtenidos. De todas las pruebas realizadas, en general, el cultivar que mostró respuesta de regeneración más alta (80%) fue el Ranglander.

Aunque Phillips (1983) concluye que los genes que controlan la regeneración morfogenética *in vitro* aparecen a la misma

frecuencia relativa en las poblaciones de alfalfa. Brown y Atanassov (1985), sugieren que en realidad dicha frecuencia genética es mayor en aquellas poblaciones de alfalfa que posee la característica del hábito radicular rastrero cuyo linaje genético conlleva alta contribución de Ladak y *M. falcata*.

Por último Nagarajan, McKenzie y Walton (1986) manejan diez cultivares de alfalfa en su trabajo sobre embriogénesis y regeneración de plantas en cultivo de tejidos de *Medicago* spp., tres cultivares con germoplasma *M. sativa* y siete con germoplasma *M. media* que fueron cultivadas bajo tres diferentes protocolos de trabajo. Sus resultados muestran que las variedades Moapa 69, Lahontan y Peace (*M. sativa*) no formaron embriones; en cambio aquellas variedades derivadas de *M. media*, sí formaron embriones, sobresaliendo las variedades Heinrichs del que se obtuvo el mayor porcentaje de regeneración (62%), cultivar que muestra hábito radicular rastrero. Concluyen que la respuesta embriogénica está evidentemente relacionada con el genotipo y el medio de cultivo, y agregan que la calidad y cantidad de embriones condicionan significativamente la formación de plantas bien desarrolladas.

En la tabla 7 se destacan algunos de los trabajos sobre cultivo de tejidos de alfalfa, donde se registran los genotipos empleados, el tipo de inóculo, protocolos de cultivo empleados y la referencia bibliográfica. Destaca la diversidad de cultivares probados, así como de protocolos de cultivo y como se ha ido seleccionando material con respuesta embriogénica para optimizar sus rendimientos. También se refleja en esta tabla los diferentes tipos de inóculo empleados, desde tejidos jóvenes hasta tejido de peciolo y hojas adultos.



CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES DE ALFALFA (*Medicago* spp.).

Tabla 7

Genotipo	Proceso	Inóculo	Inducción		Desarrollo			Referencia
			i	ii	i	ii	i	
Clon S-4 de "Saranac"	O, ES	Anteras inmaduras Ovarios inmaduros	B	2,4-D ANA KIN			Bli2Y s/rc	Saunders y Bingham (1972)
Clones S-4, Sh 3, SE y H-275 de "Saranac"	O, ES	Ovarios inmaduros	B	2,4-D ANA KIN			Bli2y s/rc	Saunders y Bingham (1975)
Clones s-4, Sh 3, Sh 13, Sh 21 de "Saranac"; D-10 de "DuPuits"; "Vernal", "El Unico", "Sonora", "Rhizoma", "Rambler", "Roamer" y "Drylander"	SR	Hipocotilos	B	2,4-D ANA KIN			Bli2Y s/rc	Bingham, Hurley, Kaatz y Saunders (1975)
14 clones de "Regen S": de RA 1 a RA 14	O	Ovarios inmaduros Tallos Peciolo	B SH	2,4-D ANA KIN			Bli2Y SH LS B5 s/rc	Walker, Yu, Sato y Jaworski (1978)
"Regen S"	O	Ovarios inmaduros Tallos Peciolo	SH	ANA KIN	SH	2,4-D KIN	Bli2Y s/rc	Walker, Wendeln y Jaworski (1979)
"Canadian 1" y "Canadian 2"	P	Hojas	Kao	ANA Zea BAP				Kao y Michayluk (1980)
Variedad europea sin nombre	P	Hojas	UM	2,4-D KIN	MS	ANA KIN	MS s/rc	dosSantos, Outka, Cocking y Davey (1980)

Tabla 7 (continuación)

Genotipo	Proceso	Inóculo	Inducción		Desarrollo			Referencia
			<i>i</i>	<i>ii</i>	<i>i</i>	<i>ii</i>	<i>i</i>	
"Regen S"	O	Refiere a una cita de 1978	B	2,4-D ANA KIN	LS SH	2,4-D AIA KIN	SH BOi2Y s/rc	Stavarek, Croughan, Rains (1980)
H275 de "Saranac" x G11 diploide = HG 2	S, C	Ovarios inmaduros	B II	2,4-D KIN	B II	KIN	BOi2Y s/rc	Reisch y Bingham (1980)
"Canadian 1" 8 clones y "Canadian 2" 2 clones	ES, S	Internodos	A B C D liq	2,4-D ANA BAP Zea	A B C D liq	?	?	Kao y Michayluk (1981)
RS-K1 y RS-K2 de "RegenS"	ES, P	Peciolo	SH	2,4-D KIN	Bli2Y	s/rc	SH + GA ANA	Johnson, Stuteville, Higgins y Skinner (1981)
Clon RA 3 de "Regen S"	ES, R, S	Ovarios inmaduros Peciolo	SH	ANA KIN	SHliq	2,4-D KIN	Bli2Y SH s/rc	Walker y Sato (1981)
A-15	ES	Peciolo, Hojas Tejidos embri- onarios	Bli2Y	2,4-D KIN	Bli2Y	ANA KIN	Bli2Y	Novak y Konecna (1982)
"Robot"	ES, LP	Cotiledones Hipocotilos	MS B5	2,4-D BAP	MS B5	2,4-D BAP	Bli2Y MS	Luppotto (1983)
35 variedades de <u>Medicago</u> spp.	ES	Hipocotilos	SH	ANA KIN	SH	2,4-D KIN	Bli2Y	Mitten, Sa- to y Skokut (1984)
Clon RA 3 de "Regen S"	ES, S	Peciolos	SH	ANA KIN	SH	2,4-D KIN	SH + aa	Stuart y Strickland (1984a, b)

Tabla 7 (continuación)

Genotipo	Proceso	Inóculo	Inducción		Desarrollo			Referencia
			<i>i</i>	<i>ii</i>	<i>i</i>	<i>ii</i>	<i>i</i>	
"Answer", "Armor", "Banner", "Iroquois", "Multileaf", "Peak", "Rambler", "Saranac", "520", "Thor", "Citation", "Rangelander" y "Regen S"	ES,P	Hoja Hipocotilos Cotiledones	B5	2,4-D KIN	SHb	2,4-D KIN	Bli2Y LS SH B5	Atanassov y Brown (1984)
RA 3, RA 3 x falcata regen y RA 3 x falcata nonregen	ES,P	Hoja Hipocotilos Cotiledones	SH	ANA KIN	SHlig	2,4-D KIN	SH s/rc	Skokut, Manchester y Schaefer (1985)
76 variedades de <u>M. sativa</u> , <u>M. media</u> y <u>M. falcata</u>	ES	Cotiledones Hipocotilos	B5h	2,4-D KIN	SHb	2,4-D KIN	BOi2Y s/rc	Brown y Atanassov (1985)
19 clones de <u>M. sativa</u> diploide, <u>M. coerulea</u> , <u>M. falcata</u> y <u>M. xvaria</u>	ES	Hipocotilos	UM MS	2,4-D ANA KIN BAP	B5h SH	2,4-D KIN	Bli2Y s/rc	Meijer y Brown (1985)
"Heinrichs", "Beaver", "Peace", S7312 de <u>M. media</u> ; "Moapa 69", "Lahontan" de <u>M. sativa</u> ; Br1, Br2, Le1 y Le2 de <u>M. media</u>	ES	Hipocotilos Radículas	B B + SH	2,4-D KIN	LS SH BOi2Y	AIA 2,4-D KIN	LS SH B	Nagarajan, McKenzie y Walton (1986)
F1, F2 de <u>M. sativa</u> spp. <u>falcata</u>	ES	Hipocotilos Peciolos Tallos y Raíz	MS	2,4-D KIN				Meijer y Brown (1985)
"Heinrichs", "Beaver", Br1, Le1 de <u>M. media</u>	ES	Radículas Hipocotilos	B SH	2,4-D KIN	Bli2Y		B	Nagarajan y Walton (1987)

Tabla 7 (continuación)

Genotipo	Proceso	Inóculo	Inducción		Desarrollo			Referencia
			<i>i</i>	<i>ii</i>	<i>i</i>	<i>ii</i>	<i>i</i>	
F.1.1 y F.1.2 de <i>M. sativa</i> spp. <i>falcata</i> , LR34 de "Rangelander", RM31 de "Rambler", VR5 de "Vernal", RS24 y RA 3 de "Regen S"	ES	Peciolos	MS	2,4-D KIN			MS s/rc	Meijer y Brown (1987a, b)
"Regen S", "Rambler" y "Rangelander"	ES, P	Hojas	Kao A	2,4-D ANA KIN			A s/rc	Dijak y Brown (1987a, b)

*i* = medio de cultivo basal que probaron; *ii* = reguladores del crecimiento empleados; s/rc = sin reguladores del crecimiento; liq = medio de cultivo líquido; O = organogénesis; ES = embriogénesis somática; P = protoplastos; R = rizogénesis; S = cultivos en suspensión; C = obtención de un clon embriogénico; LP = cultivos a largo plazo; SR = selección recurrente de material embriogénico: Regen S y Regen Y; MS = Murashige y Skoog (1962); SH = Schenk y Hildebrandt (1972); Kao, A, B, C, D = medio basales establecidos por Kao para protoplastos; B5 = Gamborg, Miller y Ojima (1968); Linsmaier y Skoog (1965); B = Blaydes (1966); B0i2y ó B1i2Y = Bingham et al (1975); B5h = B5 modificado por Brown y Atanassov (1985); SHb = SH modificado por Brown y Atanassov (1985); B II = B modificado por Reish y Bingham (1980); UM = Uchiyama y Murashige (1974); 2,4-D = ácido 2,4-diclorofenoxiacético; AIA = ácido indolacético; ANA = ácido naftalenacético; KIN = cinetina; BAP = benzilaminopurina; Zea = zeatina; GA = ácido giberélico; aa = aminoácidos.

En México contamos con variedades de alfalfa esencialmente de la especie *M. sativa*, que se han adaptado bien a las diferentes regiones alfarferas del país, obteniéndose así, una buena producción de forraje para cubrir las necesidades más inmediatas de alimentación de ganado, lo cual solamente representa el 10% de la demanda real de este forraje a nivel nacional. Para el mejoramiento genético y la selección de variedades, se ha trabajado con material adaptado (ecotipos) y con el material introducido tanto de *M. sativa* como de *M. media* y *M. falcata*, sin embargo, se ha observado que el material adaptado a condiciones de inviernos crudos (condición ambiental que no figura en nuestro país) requiere de tan sólo un mínimo descenso de la temperatura ambiente durante los meses invernales para que detengan su crecimiento, entren en etapa de letargo y consecuentemente desciende la producción. Esto resulta crítico para el agricultor ya que disminuyen los niveles de producción de este forraje precisamente en épocas del año en las que es difícil contar con alimento fresco para el ganado. Como las fluctuaciones de temperatura a lo largo del año en nuestro país no son marcadamente diferentes en comparación con las de los países de otras latitudes y se ha visto que las variedades de alfalfa generalmente de *M. sativa* toleran bien nuestras condiciones climáticas, procurando buenos rendimientos de producción y, en ocasiones estas han mostrado resistencia a plagas y enfermedades son las razones fundamentales de que este material sea el que se cultive más ampliamente en México. El presente trabajo se justifica desde considerar a la alfalfa como la leguminosa forrajera por excelencia, de alta calidad como alimento y las ventajas que ofrece la metodología de la embriogénesis somática aplicado a los cultivos *in vitro* como una herramienta que ayude a resolver la problemática que enfrenta el cultivo basándonos en la serie de trabajos sobre el cultivo de tejidos en alfalfa.

### III: OBJETIVOS

Los objetivos que se persiguen en este trabajo son:

- a) Conocer y obtener germoplasma de *Medicago sativa* L. que se cultive ampliamente en México;
- b) establecer cultivos asépticos de callo de diferentes variedades de *Medicago sativa* L. que se cultiven en México;
- c) emplear cuatro protocolos de cultivo diferentes basados en los trabajos previos de cultivo de tejidos de alfalfa;
- d) observar el tipo de respuesta morfogénica que se presente en los cultivos;
- e) determinar la respuesta embriogénica y rendimiento para cada variedad sometida a los cultivos *in vitro*.

## IV. MATERIAL Y METODOS.

### SELECCION DEL MATERIAL BIOLOGICO

Las semillas de alfalfa *Medicago*. spp. de las variedades Puebla 76, INIA 76, Bajío 76, Sintético I Jardín, Sintético II Hidalgo, Moapa 69, San Joaquín II, Velluda Peruana y Valencia-na fueron amablemente proporcionadas a través del Ing. Luis Castro Acero, por el Centro de Investigaciones Agrícolas de la Mesa Central, Campo Agrícola Experimental Valle de México, INIFAP, SARH, Chapingo, Edo. de México; y la variedad A 70-34 adquirida a través de la M. en C. Thelma L. Villegas G. y gracias a la gentileza del Dr. Daniel C.W. Brown de la Sección de Ingeniería del Centro de Investigaciones Vegetales de la Universidad de Ottawa, Ontario, Canadá.

### MEDIOS DE CULTIVO.

Los medios de cultivo como la base de elementos nutritivos que normalmente requiere una planta, incluyen macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, una fuente de carbono, reguladores del crecimiento y complejos orgánicos (Hartman y Kester, 1980). Para su preparación se emplearon reactivos de grado analítico de las marcas Merck, Sigma y Mallinckrodt y para el caso de los complejos como hidrolizado de caseína y extracto de levadura fueron de la marca Difco. Los reactivos se pesaron en balanza analítica y se manejaron como soluciones patrón para facilitar la preparación de los medios, para cuyo procedimiento se empleó agua desionizada y se gelificaron con 8 g/l de agar grado bacteriológico. El pH de los medios MSM (Murashige y Skoog, 1962 modificado por Meijer y Brown, 1987b), SHW (Schenk y Hildebrandt, 1972 modificado por Walker y Sato, 1981) y Bli2Y (Bingham *et al.*, 1975) se ajustó a  $5.9 \pm 0.1$  y para el medio B5V (Gamborg *et al.* 1968 modificado por Villegas) se ajustó a  $5.5 \pm 0.1$ . La esterilización de los medios incluyendo vitaminas y reguladores del crecimiento, se realizó en autoclave a  $1.05 \text{ kg/cm}^2$  de presión a  $121^\circ\text{C}$  de temperatura durante 20 minutos. Finalmente, estos se vertieron a razón de 10 ml. en cajas de petri de  $60 \times 15 \text{ mm}$ , o bien 20 ml en frascos de tipo Gerber de 50 ml. de capacidad, para establecer los cultivos. Para propagación clonal de plantas a través de internos se emplearon tubos de ensaye de  $170 \times 18 \text{ mm}$  conteniendo 13ml de medio de cultivo, o bien en recipientes plásticos de policarbonato conteniendo 50 ml. de medio.

La composición química de los medios de cultivo basales manejados para este trabajo se detallan en la Tabla 8.

Para la realización de este trabajo se seleccionaron cuatro protocolos de cultivo diferentes, cada uno de los cuales incluye un medio de cultivo específico, reguladores del crecimiento

Tabla 8.

Composición química de los medios de cultivo MSM (Murashige y Skoog, 1962, modificado por Meijer com. pers.), SHW (Schenk y Hildebrandt, 1972 modificado por Walker y Sato, 1981), B5V (Gamborg, Miller y Ojima, 1968 modificado por Villegas com. pers.) y Bli2Y (Blaydes, 1966 modificado por Bingham et. al., 1975) utilizados en el desarrollo experimental.

	M S M		S H W		B 5 V		B l i 2 Y	
Macronutrientes	mg/l	mM	mg/l	mM	mg/l	mM	mg/l	mM
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400	5.0	-	-	-	-	1000	12.5
KNO <sub>3</sub>	3535	35.0	2500	24.7	2528	25.0	1000	9.9
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440	3.0	200	1.36	750	5.13	-	-
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370	1.5	400	1.62	500	2.02	35*	0.3
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	1.25	-	-	-	-	300	2.2
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	300	2.61	-	-	-	-
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	150	1.09	-	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	-	2827	19.7	-	-
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	-	-	347	2.1
KCl	-	-	-	-	-	-	65	0.9
Micronutrientes	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	100	5.0	80.9	3.0	48.5	1.6	25.9
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22.3	100	10.0**	60.0	10.0	59.2	4.4*	29.1
Zn SO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.6	30	1.0	3.5	2.0	6.9	1.5*	9.2
KI	0.83	5	1.0	6.0	0.75	4.52	0.8	4.8
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25	1.03	0.1	0.413	0.25	1.03	-	-
Cu SO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025	0.10	0.2	0.801	0.025	0.100	-	-
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025	0.105	0.1	0.420	0.025	0.105	-	-
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8	100	15.0	54.0	27.8	100.0	23.6	0.086
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3	100	20.0	53.7	37.3	100.0	32.0	0.086
Vitaminas	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM	mg/l	µM
Ac. nicotínico	0.5	4.06	5.0	40.6	1.0	8.12	0.5	2.43
Piridoxina HCl	0.5	2.43	0.5	2.43	1.0	4.68	0.1	0.49
Tiamina HCl	0.1	0.29	5.0	14.8	10.0	29.6	0.1	0.30
Glicina	2.0	26.6	-	-	-	-	2.0	26.6
Inositol	100.0	555.0	100.0	555.0	100.0	555.0	100.0	555.0
Sacarosa	30 g/l		30 g/l		30 g/l		30 g/l	
Extracto de levadura	-		-		-		2 g/l	
Hidrolizado de caseína	-		1.5 g/l		-		-	
Sulfato de adenina	-		-		0.1 mg/l		-	
* Reactivos empleados sin grado de hidratación								
** monohidratado (MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O)								



to, el tiempo que dura cada resiembra de tejido o de callo tanto en el medio de inducción como en el de regeneración y las condiciones físicas de incubación. Estos cuatro protocolos previamente empleados por algunos autores, fueron escogidos porque cada uno de ellos ha sido mejorado para la formación de callo y obtención de embriones somáticos de alfalfa en material de *M. sativa*, *M. falcata* y *M. media* primordialmente de acuerdo con los reportes bibliográficos revisados. Las diferencias que tienen entre sí estos protocolos escogidos, permitirán observar la respuesta del cultivo del material vegetal procedente de variedades de alfalfa que se cultiven en nuestro país. De las diez variedades empleadas en este estudio, sólo la A 70-34 es material embriogénico, sin embargo sólo se emplea como punto de comparación con el resto de las variedades, en dos de las cuales ya ha habido reportes de su cultivo *in vitro*, específicamente para Moapa 69 (Mitten *et al.*, Brown y Atanassov, 1985; Nagarajan *et al.*, 1986) que de acuerdo a estos reportes su capacidad embriogénica ha sido nula y en Velluda Peruana, para la cual Mitten *et al.* (1984) reportaron que sólo un genotipo de 21 probados mostró ser embriogénico y en cambio, Brown y Atanassov (1985) no detectaron capacidad embriogénica para esta variedad. En las siete variedades restantes no ha habido reportes aún de su cultivo *in vitro*. A continuación se describe cada uno de los protocolos de cultivo empleados.

#### Protocolo A.

Con un medio de cultivo MSM, es decir, un medio de cultivo basal MS (Murashige y Skoog, 1962) modificado por el Dr. Eltjo G.M. Meijer (comunicación a través de la M. en C. Thelma L. Villegas y reportado en Meijer y Brown, 1987b) para la obtención de embriones somáticos del clon F.1.1 (*Medicago sativa* spp. *falcata*) con una frecuencia de regeneración mayor que lo reportado para cultivares para cultivares con alto porcentaje de formación de embriones somáticos (Meijer y Brown, 1987b).

El medio basal MSM consiste en los componentes inorgánicos del medio MS modificando la cantidad de nitrógeno con concentraciones de 5mM de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y 35mM de  $\text{KNO}_3$ . Además con 30,000 mg/l de sacarosa y adicionado con reguladores del crecimiento tal y como se registra en la tabla 9.

#### Protocolo B.

El medio SHW, contiene un medio de cultivo basal SH (Schenk y Hildebrandt, 1972) modificado por Walker y Sato (1981) para el clon RA 3 de la línea Regen S (*Medicago sativa*) con la que lograron obtener altos porcentajes de regeneración estos autores. Esta línea proviene de cepas puras de *M. sativa*.

Tabla 9.

PROTOCOLOS DE TRABAJO EMPLEADOS PARA LA OBTENCION DE EMBRIONES SOMATICOS DE *M. sativa* L.

	PROTOCOLO A	PROTOCOLO B	PROTOCOLO C	PROTOCOLO D
(a)	MS (1962)	SH (1972)	B5 (1968)	Blaydes (1966)
(b)	Meijer y Brown (1987b)	Skokut <i>et al</i> (1985)	Villegas (com. pers.)	Novak y Konecna (1982)
(c)	F.1.1 ( <i>M. sativa</i> spp <i>falcata</i> )	Regen S ( <i>M. sativa</i> )	A 70-34 ( <i>M. media</i> )	Lucerne A-15 ( <i>M. sativa</i> )
1) INDUCCION				
	MSM basal	SHW basal	B5V basal	Bli2Y
(i)	22.4µM de 2,4-D 4.7µM de KIN	25µM de ANA 10µM de KIN	9.0µM de 2,4-D 0.5µM de KIN	100µM de 2,4-D 5µM de KIN
(ii)	10 días	21 días	20 a 25 días	10 días
(iii)	16h luz/8h obsc	16h luz/8h obs	16h luz/8h obs	obscuridad
Resiembra:				
		SHW basal		Bli2Y
(i)	---	50µM de 2,4-D 5µM de KIN	---	1µM de ANA 10µM de KIN
(ii)		4 días		20 días
(iii)		16h luz/8h obs		16h luz/8h obs
2) DESARROLLO				
	MSM basal	SHW basal		Bli2Y
(i)	sin reguladores del crecimiento	sin reguladores del crecimiento	---	sin reguladores del crecimiento
(iii)	16h luz/8h obsc	16h luz/8h obsc		16h luz/8h obsc
(a) Medio de cultivo básico; (b) empleado por; ; (c) establecido para embriogénesis somática de; ; 2,4-D = ácido 2,4-diclorofenoxiacético; ANA = ácido naftalenacético; KIN = cinetina; (i) suplementado con ; (ii) tiempo de incubación; (iii) fotoperíodo.				

El medio basal SH modificado por Walker y colaboradores en 1978, 1979 y Walker y Sato en 1981, está adicionado con ANA, 2,4-D y cinetina como fuente de auxinas y citocinina respectivamente en las condiciones señaladas en la tabla 9. Skokut *et al.* (1985) resumen finalmente en su reporte las modificaciones realizadas por Walker y coautores para este protocolo de trabajo, y adicionan aminoácidos al medio de cultivo, de tal manera que SHW contiene 1.5 mg/l de hidrolizado de caseína como fuente de aminoácidos.

### Protocolo C.

El medio B5V incluye un medio basal B5 de Gamborg, Miller y Ojima (1968) modificado por Villegas G. (comunicación personal) protocolo establecido para el clon A 70-34 obtenido de la variedad Rangelander (*M. media* con fuerte aportación de *M. falcata*) y que bajo cultivo se ha logrado obtener más de veinte embriones por peciolo de 10 mm de longitud en cultivo a los 21 días aproximadamente.

Este medio B5V, consiste en las sales inorgánicas y vitaminas del medio B5 complementado con 1 mg/l de sulfato de adenina, 750 mg/l (5.13mM) de  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y reguladores del crecimiento tal y como se indica en la tabla 9.

### Protocolo D.

Medio basal de Blaydes (1966) modificado por Bingham *et al.* (1975) abreviado como Bli2Y. Este medio fue inicialmente empleado para probar con diferentes variedades de *M. media* y *M. sativa*, por Bingham y colaboradores (1975) y para cultivo de material seleccionado por su potencial de regeneración *in vitro* (Saunders y Bingham, 1972, 1975) como es el caso de la variedad Regen S. En trabajos posteriores se ha empleado este medio Bli2Y por Reisch y Bingham (1980) para un clon diploide HG 2; Johnson *et al.* (1981) para dos clones de Regen S: RS-K1 y RS-K2 en combinación con un medio SH; por Novak y Konecna (1982) para el cultivar checoslovaco A-15 de *M. sativa*; por Luppotto (1983) para el cultivar mediterráneo Robot y en trabajos en los que se han empleado diferentes variedades de alfalfa con el fin de detectar su potencial de regeneración *in vitro*, a veces en combinación con otros medios de cultivo como SH, B5 ó LS (Linsmaier y Skoog, 1965, en Atanassov y Brown, 1984) o bien como único medio basal (Mitten *et al.*, 1984; Atanassov y Brown, 1984; Brown y Atanassov, 1985).

La modificación que realizaron Bingham y colaboradores en 1975 consiste en complementar al medio basal de Blaydes (1966) con 2 g/l de extracto de levadura y 100 mg/l (0.57mM) de inositol. El protocolo de trabajo de Novak y Konecna (1982) se deta-

llan en la tabla correspondiente.

Como se ha venido mencionando, en la tabla 9 se resumen las condiciones de cultivo para cada uno de los cuatro protocolos anteriormente descritos.

#### CONDICIONES FISICAS.

En general los cultivos se mantuyieron en un cuarto de incubación a una temperatura de  $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , sometidos a un fotoperíodo de 16 horas de iluminación contra 8 horas de oscuridad, a excepción de la etapa de inducción de el protocolo D, donde se señala que en esta fase los cultivos deben permanecer en completa oscuridad. La iluminación se proporcionó con tubos de luz fría blanca Sylvania de 40 W a una distancia de 90 cm de los frascos de cultivo.

#### DESINFESTACION Y GERMINACION DE LAS SEMILLAS

A partir de esta etapa las semillas y los inóculos se manejaron bajo condiciones de asepsia trabajando en una campana de flujo laminar. Las semillas se sumergieron en alcohol etílico al 90% durante un minuto, al cabo del cual se remojaron en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 30% (Cloralex con 0.6% de cloro activo) durante 5 minutos; posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril dejándolas remojando durante 24 horas en el último enjuague, después de lo cual, se remojaron nuevamente en la solución de hipoclorito de sodio al 30% durante un minuto para concluir la desinfestación enjuagando nuevamente con agua estéril tres o cuatro veces a fin de eliminar los residuos de sodio que pudieran haber quedado impregnados en las semillas. Las semillas se sembraron en frascos de tipo Gerber con medio MS ó SH basal al 50% y se incubaron durante las primeras 24 horas en oscuridad a fin de favorecer la germinación y posteriormente bajo fotoperíodo de 16 horas luz/ 8 de oscuridad y a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

#### SIEMBRA DE LOS TEJIDOS

Transcurridos de 10 a 15 días de que germinaron las semillas, las plántulas se fragmentaron con material quirúrgico esterilizado o simplemente remojado en alcohol y flameado, separando los tejidos embrionarios en: hojas cotiledonarias, hipocotilos y radícula. Estos dos últimos tejidos embrionarios se seccionaron en fracciones de aproximadamente 10 mm de longitud, en cambio a los cotiledones se les practicó una pequeña incisión lateral para favorecer la formación de callo. Cada plántula seccionada se inoculó a razón de una plántula por frasco en el medio de cultivo inicial de cada uno de los protocolos.

los anteriormente descritos, empleando 10 réplicas, es decir, 10 plantas de cada variedad de alfalfa incluidas en este trabajo. Asimismo se procuró obtener el epicotilo o zona meristemática de cada plántula, la cual fué sembrada en un medio basal MS al 50% de su concentración total para así conservar material vegetativo en condiciones de asepsia. Algunas plántulas germinadas asépticamente y que no fueron requeridos sus tejidos embrionarios se mantuvieron creciendo bajo las mismas condiciones.

Otro tipo de inóculo que ha dado buenos resultados en producción de callo y embriogénesis somática de alfalfa han sido los peciolos de plantas jóvenes (Brown y Atanassov, 1985) y dada la facilidad de manejo de estos también se emplearon como fuente de inóculo en este trabajo. Estos se obtuvieron de plantas crecidas asépticamente y mantenidas en el cuarto de incubación de más de 30 días de edad en que los peciolos tienen ya un grosor de 1 mm aproximadamente. Se fragmentaron algunas ramitas de cada planta y se seccionaron separando los peciolos del tallo y las hojas de los peciolos, estos se cortaron en pequeños segmentos de 10 mm de longitud aproximadamente y se inocularon a razón de 10 réplicas de cada variedad en cada medio de cultivo de acuerdo a los esquemas señalados anteriormente.

Las resiembras de los callos se realizaron de acuerdo al tiempo señalado por cada protocolo de cultivo.

Los embriones somáticos observados se separaron cuidadosamente del callo del que se originaron y fueron sembrados individualmente en un medio MS ó SH ambos al 50% para permitir una adecuada conversión en plantas. Se registró la formación de callo por cada inóculo y las características morfológicas de los mismos tales como: color, consistencia, tamaño relativo, así como la aparición y número de centros embriogénicos y de embriones somáticos observados y su ulterior desarrollo.

## V. RESULTADOS

### SELECCION Y OBTENCION DE GERMOPLASMA DE ALFALFA.

Las nueve variedades empleadas en este trabajo son algunas de aquellas que se cultivan ampliamente en nuestro país y que generalmente tienen una carga genética de *Medicago sativa*, dado que estas permiten cultivos más rendidores en las diferentes áreas alfalferas de México. En cambio, material procedente de *M. media* ó *M. falcata* no resulta idóneo de cultivar en México donde las temperaturas durante los meses invernales no son tan bajas como en países de otras latitudes. Las variedades de *M. sativa* han tolerado bien las condiciones climáticas a lo largo de todo el año de nuestro país, tolerando las bajas temperaturas de la época fría y con la ventaja de que en esta época no caen en letargo sino que están en constante producción sobresaliendo algunas por sus altos rendimientos en forraje verde y su buena recuperación después de cada corte.

La variedad A 70-34 fué empleada estrictamente como control en los cultivos *in vitro*, ya que es material embriogénico seleccionado a partir de germoplasma de *M. media*.

Algunas características agronómicas sobresalientes de cada cultivar manejado en este trabajo se enuncian en el apéndice A. Es importante tener en cuenta esta información porque probablemente se pueda relacionar con los resultados obtenidos.

### RESPUESTA DE LAS DIEZ VARIEDADES EN CULTIVO

De los cuatro tipos de tejidos o inóculos sometidos a cultivo, prácticamente de todas las variedades, en todos se observó la formación de callo aunque hubo diferencias entre los tipos de callo entre variedades y entre planta y planta de una misma variedad, lo cual no resulta extraño sobretodo si se considera la influencia del genotipo como previamente señalaron Saunders y Bingham (1972) y Meijer y Brown (1987b). Sin embargo, la condición de que se produzca callo a partir de un inóculo no necesariamente implica que este sea embriogénico (Brown y Atanassov, 1985) de tal manera que observamos callos de tamaños relativos diferentes: pequeños (0.02g a 0.2g de peso fresco), medianos (0.021g a 0.9g de peso fresco) y grandes (de 0.91g de peso fresco en adelante). Asimismo, hubo diferencias en cuanto a su consistencia: callos friables (desmenuzables) hasta duros y resecos; en cuanto al color, por lo general fueron callos color amarillo o crema y en ocasiones blancos, verdes y muchas veces con tintes verdes de claro o café claro, también se detectaron callos de color



lor crema o blancos con puntos verde claro no superficialles a manera de pequeñas áreas semiorganizadas que se interpretaron como callos con una inducción embriogénica positiva aún no manifiesta y a un paso hacia la determinación embriogénica. Igualmente a causa del estrés algunos callos muy proliferativos y con más de 30 días de cultivo, se pigmentaron en tonalidades rojas, rosas o lilas denotando así la presencia de antocianinas que son pigmentos glucósidos de las plantas superiores. De acuerdo a previas referencias (Villegas, comunicación personal), un callo embriogénico de alfalfa posee un tamaño relativamente medio (0.6g de peso fresco aproximadamente), no es muy proliferativo, friable, de color amarillo o crema sobre el cual destacan los embriones somáticos color verde claro que sólo se desarrollarán si son transferidos a un medio de cultivo sin reguladores del crecimiento.

Los resultados para cada una de las variedades son en cuanto a la formación de callo, número de embriones somáticos por callo (rendimiento), respuesta embriogénica (número de callos con embriones somáticos entre número de callos totales) y algunas observaciones de los cultivos y desarrollo ulterior de los embriones somáticos.

Cabe aclarar que se planeó emplear 10 réplicas por cada experimento (variedad/ protocolo/ fuente de inóculo), sin embargo, posteriormente se emplearon un mayor número de réplicas dado que en este trabajo manejamos variedades predominantemente de *M. sativa* material considerado de baja respuesta embriogénica, por lo que en trabajo que se ocupan de monitorear material embriogénico sugieren emplear mayor número de réplicas a fin de localizar genotipos embriogénicos (Bingham *et al.*, 1975). Se encontrará entonces, que para el experimento bajo el protocolo D y manejando tejidos embrionarios de cada variedad se trabajó con 25 a 26 réplicas. También se hace la aclaración de que en los resultados se denominará a las hojas cotiledonarias como cotiledones a fin de seguir la sintaxis empleada por los diversos autores en sus reportes.

#### PUEBLA 76.

Esta variedad bajo cultivo mostró respuesta embriogénica nula en los cuatro protocolos. Algunas características sobresalientes son: bajo el protocolo A, los callos de tejidos embrionarios fueron proliferativos, brillantes, friables de color crema pero con áreas color verde claro intenso; los callos de peciolo fueron muy similares sólo que de tamaño mayor. En el protocolo B, los callos igualmente fueron muy proliferativos, friables aunque algunos resacos de color amarillo y en callos de cotiledones se observó que el 30% mostraron color verde claro. En el protocolo C los ca-



llos de peciolo fueron medianos, no proliferativos, color amarillo, friables. Los callos de tejidos embrionarios fueron muy similares y aquellos procedentes de cotiledones tuvieron puntos verde claro. Para el protocolo D predominaron callos color crema o blancos, el 15% con tonos café claro y el 50% con tonalidades verde claro, estos últimos se mostraron muy proliferativos y se observó en ellos presencia de antocianinas, incluso en callos de tejidos embrionarios hubo formación de raíces. Puebla 76 mostró en general callos proliferativos. Los resultados para Puebla 76 se registran en la tabla 10.

#### INIA 76.

La respuesta embriogénica bajo los cultivos *in vitro* de esta variedad no fué evidente. Bajo los cuatro protocolos se observó en ocasiones cierta inducción a embriogénesis; esto fué posible de interpretar al observar áreas meristemáticas color verde claro a manera de puntos embebidos aún en los callos. En el protocolo A los callos procedentes de tejidos embrionarios y de peciolo fueron de tamaño mediano, friables, color crema y 20% de los callos de peciolo mostraron puntos verde claro embebidos y enmascarados por el mismo callo y que finalmente no llegaron a desarrollarse en embriones globulares. En el protocolo B los callos en general fueron de tamaño mediano, globosos aunque en parte resecos, color crema y blanco. en el protocolo C los callos de tejidos embrionarios fueron grandes, amarillos, friables y un 20% de callos de cotiledones manifestó puntos verde claro internos; en cambio. los callos de peciolo fueron medianos color crema y café claro de los cuales el 10% de los inóculos no mostró respuesta alguna. Por último bajo el protocolo D los callos en general fueron pequeños y poco proliferativos de los cuales el 50% fué color blanco, el 25% fué amarillo y el 25% restante fué color café claro, además el 50% del total de inóculos tuvo puntos verde claro embebidos junto con áreas verde claro intenso en los callos, además de que el 20% de los callos de cotiledón y 20% de los callos de peciolo formaron raíces y varios callos de cotiledón mostraron antocianinas. Los callos con estas características finalmente no regeneraron a embriones somáticos. Ver tabla 11 de resultados.

#### BAJIO 76.

Esta variedad bajo cultivo de tejidos no mostró la formación de embriones somáticos bajo ninguno de los cuatro rotocolos probados. Los callos bajo el protocolo A fueron relativamente pequeños, color crema y friables a excepción de los callos de peciolo que más bien fueron proliferativos, color blanco y friables, de los cuales el 40% mostró tonos color verde claro y el 10% con puntos verde claro embebidos.

Formación de callo y respuesta embriogénica de la variedad PUEBLA 76  
 Tabla 10. de alfalfa bajo cultivo de tejidos.

	Inóculo	Formación de callo	Observaciones de los callos	Respuesta %	Rendimiento
Protocolo A	Cotiledones	+	av	0	0
	Hipocotilo	+	av	0	0
	Radícula	+	av	0	0
	Peciolo	+		0	0
Protocolo B	Cotiledones	+	av	0	0
	Hipocotilo	+		0	0
	Radícula	+		0	0
	Peciolo	+		0	0
Protocolo C	Cotiledones	+		0	0
	Hipocotilo	+	i	0	0
	Radícula	+		0	0
	Peciolo	+		0	0
Protocolo D	Cotiledones	+	av, ant, r	0	0
	Hipocotilo	+	av, ant, r	0	0
	Radícula	+	av, ant, r	0	0
	Peciolo	+	av	0	0

Respuesta = No. de callos con embriones/ no. de callos totales, expresado en porcentaje; Rendimiento = promedio de embriones por callo; av = áreas verde claro en el callo; ant = antocianinas en el callo; r = raíces en el callo; i = inducción a embriogénesis, puntos verde claro en el callo; + = formación de callo.

Formación de callo y respuesta embriogénica de la variedad INIA 76 de alfalfa bajo cultivo de tejidos.					
Tabla 11.	Inóculo	Formación de callo	Observaciones de los callos	Respuesta %	Rendimiento
Protocolo A	Cotiledones	+		0	0
	Hipocotilo	+		0	0
	Radícula	+		0	0
	Peciolo	+	i	0	0
Protocolo B	Cotiledones	+		0	0
	Hipocotilo	+		0	0
	Radícula	+		0	0
	Peciolo	+		0	0
Protocolo C	Cotiledones	+	i, ant	0	0
	Hipocotilo	+		0	0
	Radícula	+		0	0
	Peciolo	+		0	0
Protocolo D	Cotiledones	+	av, ant, r	0	0
	Hipocotilo	+	av	0	0
	Radícula	+	av	0	0
	Peciolo	+	av, r	0	0

Respuesta = No. de callos con embriones/ no. de callos totales, expresado en porcentaje; Rendimiento = promedio de embriones por callo; av = áreas verde claro en el callo; ant = antocianinas en el callo; r = raíces en el callo; i = inducción a embriogénesis, puntos verde claro en el callo; + = formación de callo.

Bajo el protocolo B los callos en general fueron grandes, friables y de color crema. En el protocolo C se detectaron callos de tejido embrionario de tamaño mediano, de los cuales el 10% mostró tonalidades de color verde claro intenso, característica de la cual posiblemente derivarían estructuras embriogénicas, lo cual no ocurrió. Los callos de peciolo en el protocolo D fueron pequeños y medianos, resecos y de color crema, un tanto opacos. Por otra parte, los callos de tejidos embrionarios bajo este mismo protocolo fueron medianos color crema y brillantes con tonalidades de color verde claro, de donde el 20% del total de réplicas probadas mostraron callos con puntos verde claro embebidos y que al microscopio se observan aún disgregados, no formando una estructura morfológica específica. En general Bajío 76 no mostró respuesta embriogénica, sin embargo sí hubo inducción. Los resultados se registran en la tabla 12.

#### SINTETICO I JARDIN.

Sintético I Jardín mostró respuesta embriogénica en una de 25 réplicas en el protocolo D en callo de hipocotilo. Los callos de tejidos embrionarios y de peciolo bajo este mismo protocolo D fueron callos pequeños o medianos, de color crema con áreas verde claro. Bajo el protocolo A se observaron callos grandes, friables, globosos, color crema, con antocianinas, el 40% de callos de peciolo con áreas verde. En el protocolo B solamente se observaron callos medianos color blanco o crema y los hubo tanto friables como resecos. En el protocolo C los callos no fueron proliferativos, de color crema y verde claro o café claro, este tipo de callos se asemejaron mucho en apariencia a los callos embriogénicos de A 70-34. En 20% de los inóculos de cotiledones, hipocotilo y radícula se observaron puntos verde claro embebidos y en callos de peciolo de más de 30 días en cultivo se observó la presencia de antocianinas. Los resultados de esta variedad se registran en la tabla 13.

#### SINTETICO II HIDALGO.

Esta variedad en los cultivos mostró características embriogénicas en sus callos donde el 10% de las réplicas sí formó 3 embriones somáticos para cada uno de los protocolos B y D. Como se observa en la tabla 14, no fué posible cubrir la totalidad de los protocolos de cultivo con todos los tipos de inóculos planeados en principio; específicamente no se probó el efecto de los protocolos A, C y D con tejidos embrionarios a causa de contaminación sistémica con bacterias al emplear las semillas durante la etapa de germinación y establecimiento de cultivos asépticos. Esto se logró solo una vez de manera fortuita ya que al repetir varias veces el proceso de desinfección no se obtuvieron los mismos resultados. De esta manera se trabajó con tejidos embriona-

Formación de callo y respuesta embriogénica de la variedad BAJIO 76 de alfalfa bajo cultivo de tejidos..

	Inóculo	Formación de callo	Observaciones de los callos	Respuesta %	Rendimiento
Protocolo A	Cotiledones	+		0	0
	Hipocotilo	+	i	0	0
	Radícula	+		0	0
	Peciolo	+	i, av	0	0
Protocolo B	Cotiledones	+		0	0
	Hipocotilo	+		0	0
	Radícula	+		0	0
	Peciolo	+		0	0
Protocolo C	Cotiledones	+		0	0
	Hipocotilo	+		0	0
	Radícula	+	i	0	0
	Peciolo	+		0	0
Protocolo D	Cotiledones	+	i, av	0	0
	Hipocotilo	+	i, av	0	0
	Radícula	+	i, av	0	0
	Peciolo	+		0	0

Respuesta = No. de callos con embriones/ no. de callos totales, expresado en porcentaje; Rendimiento = promedio de embriones por callo; av = áreas verde claro en el callo; i = puntos verde claro embebidos en el callo, inducción a embriogénesis.

Formación de callo y respuesta embriogénica de la variedad SINTETICO I  
 Tabla 13. JARDIN de alfalfa en cultivo de tejidos.

	Inóculo	Formación de callo	Observaciones de los callos	Respuesta %	Rendimiento
Protocolo A	Cotiledones	+	ant	0	0
	Hipocotilo	+	ant	0	0
	Radícula	+	ant	0	0
	Peciolo	+	ant, av	0	0
Protocolo B	Cotiledones	+		0	0
	Hipocotilo	+		0	0
	Radícula	+		0	0
	Peciolo	+		0	0
Protocolo C	Cotiledones	+	i, av	0	0
	Hipocotilo	+	i	0	0
	Radícula	+	i	0	0
	Peciolo		ant, av	0	0
Protocolo D	Cotiledones	+	av	0	0
	Hipocotilo	+	es, av	4	1
	Radícula	+	av	0	0
	Peciolo	+	av	0	0

Respuesta = No. de callos con embriones/ no. de callos totales, expresado en porcentaje; Rendimiento = promedio de embriones por callo; av = áreas verde claro en el callo; ant = antocianinas; i = puntos verde claro embebidos en el callo, inducción a embriogénesis; es = embrión somático observado al menos en estado globular.

rios solo para el protocolo B y con peciolo para los cuatro protocolos de cultivo. Bajo el protocolo A se observaron callos poco proliferativos, brillantes de color verde intenso que no formaron embriones. En el protocolo B en callos de peciolo si hubo embriones somáticos. Los callos de tejidos embrionarios fueron medianos, color crema friables y con un ligero color verde claro. Los callos de peciolo para el protocolo C, fueron medianos, friables de color crema y con algunas zonas color café claro, de los cuales en dos de las réplicas se observaron 4 embriones somáticos en total con un rendimiento de 2 embriones por callo. En el protocolo D se observan callos de peciolo pequeños friables y otros resecos, el 40% de los cuales mostraron puntos verde claro embebidos, lo que se interpreta como respuesta proembriogénica que no culminó en tal. Estos resultados nos muestran que Sintético II Hidalgo tiene un potencial embriogenético promotor sobre el cual se debería continuar probando su cultivo salvando las dificultades que ha representado la desinfestación de la semilla y emplear procedimientos un tanto severos que eliminen el problema de la contaminación por microorganismos, pero que no perjudiquen la planta en desarrollo.

#### MOAPA 69.

En este trabajo Moapa 69 mostró respuesta embriogénica a diferencia de los trabajos previos de Mitten *et al.* (1984), quienes sólo reportan áreas verdes semiorganizadas en sus cultivos; Brown y Atanassov (1985) con 0% de formación de embriones somáticos y Nagarajan *et al.* (1986) quienes reportan haber obtenido callo no embriogénico de esta variedad. El rendimiento obtenido de Moapa 69 fué de 2 a 3 embriones por callo embriogénico.

Esta variedad comercial mostró respuesta embriogénica bajo los protocolos A y D con 10% de respuesta respectivamente. En el protocolo A los callos fueron de tamaño mediano, friables y color crema con verde claro. El 10% de callos de cotiledones y de hipocotilo dió lugar a embriones somáticos en estado globular y torpedo a un rendimiento bajo. En el protocolo B los callos fueron relativamente pequeños de color crema casi blancos y algunos con tonos verde claro aún en el medio de inducción y que al transferirlos al medio de regeneración se tornaron a color amarillo con tonos café claro. En el caso de callos provenientes de peciolo el 10% mostró áreas verdes claro intenso. En el protocolo C, los callos tuvieron ligeros tonos verde claro que con el paso de los días sólo conservaron su color crema; fueron muy proliferativos al punto que se tocaban entre sí, friables, algunos callos mostraron coloración rojiza de antocianinas. En el protocolo D, en general los callos de todos los inóculos fueron friables, de tamaño mediano, blancos con tonos verde claro, asemejándose mucho en apariencia a los callos embriogénicos. Una réplica de



Tabla 14. Formación de callo y respuesta embriogénica de la variedad SINTETICO II HIDALGO de alfalfa en cultivo de tejidos.					
	Inóculo	Formación de callo	Observaciones de los callos	Respuesta %	Rendimiento
Protocolo A	Cotiledones	-		-	-
	Hipocotilo	-		-	-
	Radícula	-		-	-
	Peciolo	+	av	0	0
Protocolo B	Cotiledones	+		0	0
	Hipocotilo	+		0	0
	Radícula	+		0	0
	Peciolo	+	es	10	3
Protocolo C	Cotiledones	-		-	-
	Hipocotilo	-		-	-
	Radícula	-		-	-
	Peciolo	+	es, i	10	2
Protocolo D	Cotiledones	-		-	-
	Hipocotilo	-		-	-
	Radícula	-		-	-
	Peciolo	+	i	0	0

Respuesta = No. de callos con embriones/ no. de callos totales, expresado en porcentaje; Rendimiento = promedio de embriones por callo; av = áreas verde claro en el callo; i = inducción a embriogénesis, puntos verde claro embebidos en el callo; es = embriones somáticos observados, al menos en estado globular; + = formación de callo; - = protocolo no cubierto.

callos de peciolo regeneró un total de 15 embriones globulares y en estado torpedo. Los resultados de los cuatro protocolos se registran en la tabla 15. Ante la respuesta embriogénica que mostró Moapa 69 en dos protocolos de cultivo, se realizó un experimento manejando como inóculos cotiledón e hipocotilo, bajo el protocolo A con un medio basal MSM, y variando la concentración de los reguladores del crecimiento, de la auxina 2,4-D: 0.5, 1.0 y 2.0mg/l, de de cinetina como fuente de citocinina 0.1, 0.2 y 0.3mg/l para el medio de inducción. Las observaciones y resultados de este experimento se resumen en la tabla 16. Aquí se observa que en cuatro tratamientos es evidente la formación de embriones somáticos, de los cuales bajo el tratamiento con 1.0/0.2 de 2,4-D/cinetina se observó una mejor calidad en su desarrollo hasta el estado torpedo y que no culminó en una planta. El resto de los embriones observados no germinaron de manera normal, o bien, hubo algunos que revertieron a callo. Se observó asimismo, cierta tendencia de formación de raíces en callos sometidos a la concentración más baja de 2,4-D (0.5mg/l) y la respuesta embriogénica se encontró más enfocada a niveles de 1.0 a 2.0mg/l de 2,4-D y 0.2 a 0.3mg/l de cinetina. Con este experimento se corrobora el 10% de respuesta embriogénica que se había observado previamente para Moapa 69.

#### SAN JOAQUIN II.

Al igual que con Sintético II Hidalgo, San Joaquín II mostró problema de contaminación sistémica en su semilla, ante lo cual tal y como se registra en la tabla 17, se cubrieron de manera parcial los protocolos A y D y de manera total los protocolos B y C. En el protocolo A los callos de peciolo fueron de tamaño mediano, color crema friables. Bajo el protocolo B los callos mostraron características similares, su coloración fué crema con áreas verde claro, que para el caso de peciolo se asemejaron en apariencia al callo embriogénico de A 70-34. Bajo el protocolo C, los callos tuvieron color blanco y verde claro, tamaño grande, proliferativos, friables, con antocianinas en callos de cotiledón. Bajo el protocolo D, los callos de peciolo fueron de tamaño pequeño, poco proliferativos, resacos, color blanco con verde claro que posteriormente se tornaron crema. San Joaquín II bajo los tratamientos de cultivo probados no manifestó respuesta embriogénica.

#### VELLUDA PERUANA.

En el trabajo de Mitten y colaboradores en 1984, se reporta que trabajaron igualmente con esta variedad entre otras, donde uno de veintidós genotipos probados resultó ser embriogénico, en cambio, Brown y Atanassov (1985) reportan 0% de obtención de embriones somáticos en sus cultivos.

Tabla 15. Formación de callo y respuesta embrionógica de la variedad MOAPA 69 de alfalfa en cultivo de tejidos.

	Inóculo	Formación de callo	Observaciones de los callos	Respuesta %	Rendimiento
Protocolo A	Cotiledones	+	av, es	10	2
	Hipocotilo	+	av, es	10	2
	Radícula	+	av	0	0
	Peciolo	+	av	0	0
Protocolo B	Cotiledones	+		0	0
	Hipocotilo	+		0	0
	Radícula	+		0	0
	Peciolo	+	av	0	0
Protocolo C	Cotiledones	+		0	0
	Hipocotilo	+		0	0
	Radícula	+		0	0
	Peciolo	+	ant	0	0
Protocolo D	Cotiledones	+	av, ant	0	0
	Hipocotilo	+	av, ant	0	0
	Radícula	+	av, ant	0	0
	Peciolo	+	es	10	3

Respuesta = No. de callos con embriones / no. de callos total, expresado en porcentaje; Rendimiento = promedio de embriones por callo; av = áreas verde claro en el callo; ant = antocianinas en callos; es = embriones somáticos observados, al menos en estado globular; + = formación de callo.

Respuesta del cultivo de cotiledones e hipocotilo de MOAPA 69 bajo el protocolo A bajo nueve tratamientos con diferentes concentraciones de Ac. 2,4-diclorofenoxiacético(2,4-D)/ cinetina (KIN).

Concentraciones de 2,4-D/ KIN mg/l	Inóculo	Morfogénesis	Respuesta %
0.5/0.1	Hipocotilo	nula	0
	Cotiledones	raíces	0
1.0/0.1	Hipocotilo	nula	0
	Cotiledones	raíces	0
2.0/0.1	Hipocotilo	2 embriones somáticos	10
	Cotiledones	nula	0
0.5/0.2	Hipocotilo	nula	0
	Cotiledones	raíces	0
1.0/0.2	Hipocotilo	puntos verdes en callo	0
	Cotiledones	1 embrión somático y raíz	10
2.0/0.2	Hipocotilo	nula	0
	Cotiledones	puntos verdes en callo	0
0.5/0.3	Hipocotilo	nula	0
	Cotiledones	raíces	0
1.0/0.3	Hipocotilo	2 embriones somáticos y puntos ver.	10
	Cotiledones	raíces	0
2.0/0.3	Hipocotilo	3 embriones somáticos	10
	Cotiledones	nula	0

Formación de callo y respuesta embriogénica de la variedad SAN JOAQUÍN  
 Tabla 17. II de alfalfa en cultivo de tejidos.

	Inóculo	Formación de callo	Observaciones de los callos	Respuesta %	Rendimiento
Protocolo A	Cotiledones	-		-	-
	Hipocotilo	-		-	-
	Radícula	-		-	-
	Peciolo	+		0	0
Protocolo B	Cotiledones	+	av	0	0
	Hipocotilo	+	av	0	0
	Radícula	+	av	0	0
	Peciolo	+	av	0	0
Protocolo C	Cotiledones	+	av, ant	0	0
	Hipocotilo	+	av	0	0
	Radícula	+	av	0	0
	Peciolo	+	av	0	0
Protocolo D	Cotiledones	-		-	-
	Hipocotilo	-		-	-
	Radícula	-		-	-
	Peciolo	+		0	0

Respuesta = No. de callos con embriones/ no. de callos total, en porcentaje; Rendimiento = promedio de embriones por callo; av = áreas verde claro en callo; ant = antocianinas; + = formación de callo; - = protocolo no cubierto.

Velluda Peruana, variedad comercial de *M. sativa* en este trabajo mostró respuesta embriogénica bajo los protocolos A y D en una proporción semejante a la obtenida por Mitten y coautores en 1984.

En el protocolo A, los callos de tejidos embrionarios fueron de tamaño pequeño, color crema con tonos verde claro, friables, brillantes, un tanto cristalinos y a diferencia de los callos de peciolo, estos fueron más grandes, muy friables, color crema con tintes verde claro que luego de dos días de haberlos resembrado en el medio de regeneración sin reguladores del crecimiento, su coloración cambió a café claro y después el callo se necrosó por completo. Sin embargo en 10% de callo de cotiledones y de hipocotilo, se observaron dos pequeños embriones somáticos para cada caso respectivamente. En el protocolo B sólo se observaron callos pequeños y medianos, color verde con tonos café claro, friables, rescos. Bajo el protocolo C, los callos de tejidos embrionarios fueron grandes, color crema y en callos de cotiledones y radícula se observaron antocianinas. Los callos de peciolo, fueron relativamente pequeños, poco proliferativos, color crema y en uno de estos se observaron zonas color verde claro semiorganizadas, uno de cuyos puntos al parecer desarrollaría a un embrión globular, lo cual no ocurrió. Para el protocolo D, los callos de peciolo fueron de tamaño pequeño a mediano, color blanco con tonalidades café claro, friables, rescos, los callos de tejidos embrionarios fueron predominantemente medianos, color crema con áreas verde claro y en dos casos se observaron puntos verde claro bien remarcados a manera de centros embriogénicos de los cuales un genotipo de los 26 probados regeneró embriones somáticos de callos de cotiledones e hipocotilo. El resto de los callos que mostraron puntos verde claro embebidos en el callo, aún se observaron disgregados, no compactados en una estructura morfológica específica lo cual se interpreta como una inducción positiva a embriogénesis. Estos resultados se resumen en la tabla 18.

Ante estos resultados se realizó un experimento similar al de Moapa 69, empleando como inóculos cotiledones e hipocotilo, bajo el protocolo A, y modificando las concentraciones de 2,4-D a 0.5, 1.0 y 2.0mg/l y cinetina a 0.1, 0.2 y 0.3mg/l en el medio de inducción. Las observaciones y resultados se registran en la tabla 19. Aquí se observa que en tres tratamientos se desarrollaron embriones somáticos y solamente uno de estos concuerda con Moapa 69. En general los niveles de 2,4-D donde se obtuvo embriogénesis en este experimento fueron de 1.0 a 2.0mg/l y bajo niveles de citocinina de 0.1 a 0.2mg/l. Aquellos embriones que se obtuvieron bajo el tratamiento de 2.0/0.1 de 2,4-D/cinetina, mostraron mejor calidad, es decir, que completaron su desarrollo hasta el estado torpedado, sin embargo, al transferirlos a un medio sin hormonas para que completaran su desarrollo, estos reversionaron a callo. El resto de los embriones de los otros dos tra-

Formación de callo y respuesta embriogénica de la variedad VELLUDA  
 Tabla 18. PERUANA de alfalfa en cultivo de tejidos.

Protocolo	Inóculo	Formación de callo	Observaciones de los callos	Respuesta %	Rendimiento
A	Cotiledones	+	es	10	2
	Hipocotilo	+	es	10	2
	Radícula	+		0	0
	Peciolo	+		0	0
B	Cotiledones	+	av	0	0
	Hipocotilo	+	av	0	0
	Radícula	+	av	0	0
	Peciolo	+		0	0
C	Cotiledones	+	ant	0	0
	Hipocotilo	+		0	0
	Radícula	+	ant	0	0
	Peciolo	+	i	0	0
D	Cotiledones	+	av, i, es	4	28
	Hipocotilo	+	av, i, es	4	5
	Radícula	+	av, i	0	0
	Peciolo	+		0	0

Respuesta = No. de callos con embriones/ no. de callos total, en porcentaje; Rendimiento = promedio de embriones por callo; av = áreas verde claro en callo; ant = antocianinas; i = inducción a embriogénesis; es = embriones somáticos observados al menos en estado globular.



Tabla 19. Respuesta del cultivo de cotiledones e hipocotilo de VELLUDA PERUANA bajo el protocolo A con nueve tratamientos a diferentes concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)/ cinetina (KIN).

Concentraciones de 2,4-D/ KIN mg/l	Inóculo	Morfogénesis	Respuesta %
0.5/0.1	Hipocotilo	raíces	0
	Cotiledones	raíces	0
1.0/0.1	Hipocotilo	raíces	0
	Cotiledones	raíces	0
2.0/0.1	Hipocotilo	4 embriones somáticos	20
	Cotiledones	nula	0
0.5/0.2	Hipocotilo	raíces	0
	Cotiledones	nula	0
1.0/0.2	Hipocotilo	1 embrión somático	10
	Cotiledones	raíces	0
2.0/0.2	Hipocotilo	3 embriones som. y raíces	10
	Cotiledones	nula	0
0.5/0.3	Hipocotilo	nula	0
	Cotiledones	nula	0
1.0/0.3	Hipocotilo	nula	0
	Cotiledones	nula	0
2.0/0.3	Hipocotilo	nula	0
	Cotiledones	nula	0

tamientos se desarrollaron anormalmente, uno de los cuales si desarrollo raíz pero no epicotilo. La respuesta embriogénica en este caso fluctúa de un 10 a 20%, de acuerdo al número de réplicas probadas que fué diez inóculos de cada tipo de tejido embrionario, por cada tratamiento.

#### VALENCIANA.

La respuesta embriogénica y el rendimiento de los cultivos de esta variedad comercial se registra en la tabla 20. Bajo el protocolo A los callos fueron pequeños o medianos, color blanco o crema, friables. En el protocolo B se observaron callos muy proliferativos sobretodo aquellos provenientes de tejidos embrionarios, color crema y friables, algunos callos de peciolo con tonalidades verde claro. Cabe mencionar, asimismo, que algunos callos de cotiledón y de raíz al ser sembrados al medio sin reguladores del crecimiento mostraron necrosamiento en el área de contacto de los callos con el medio y dentro de los primeros tres días después de la resiembra. En el protocolo C, los callos de cotiledones fueron más proliferativos que el resto, de color crema con ligeros tonos verde claro. Bajo el protocolo D, callos a partir de peciolo tuvieron tamaño pequeño, poco proliferativos, color crema con tintes café claro, a diferencia de los callos provenientes de tejidos embrionarios que en su mayoría fueron proliferativos, friables, brillantes, color blanco a veces con tonos verde claro o café claro. En una mínima proporción de 11%, se observaron callos con puntos verde claro internos que al microscopio aún se observaron disgregados, pero que dos de estos puntos sí culminaron en embriones somáticos.

#### A 70-34

Esta línea embriogénica para la cual fué optimizado y establecido el protocolo C también fué sometida a los protocolos de cultivo restantes. Su respuesta, rendimiento y observaciones se registran en la tabla 21. Bajo el protocolo A sólo se observaron callos poco proliferativos color blanco o crema, friables. En un callo de peciolo se observó la formación de embriones somáticos a un bajo rendimiento. Bajo el protocolo B, los callos mostraron características muy similares a las del protocolo A, donde un 60% de callos de peciolo mostraron áreas color verde claro en los callos. Bajo el protocolo C obviamente se verificó la obtención de embriones somáticos con una respuesta de 80 y 100% en callos de tejidos embrionarios con un rendimiento relativamente bajo y en callos de peciolo la respuesta embriogénica se registró para todos los inóculos a un alto rendimiento. Los callos fueron color amarillo, pequeños, friables, destacándose los pequeños embriones globulares color verde claro. En total se obtuvieron 355 embriones somáticos bajo este protocolo C. Bajo el protocolo D, se observaron embriones somáticos en ca-

Formación de callo y respuesta embriogénica de la variedad VALENCIANA  
 Tabla 20. de alfalfa en cultivo de tejidos.

	Inóculo	Formación de callo	Observaciones de los callos	Respuesta %	Rendimiento
Protocolo A	Cotiledones	+		0	0
	Hipocotilo	+		0	0
	Radícula	+		0	0
	Peciolo	+		0	0
Protocolo B	Cotiledones	+		0	0
	Hipocotilo	+		0	0
	Radícula	+		0	0
	Peciolo	+		0	0
Protocolo C	Cotiledones	+		0	0
	Hipocotilo	+		0	0
	Radícula	+		0	0
	Peciolo	+		0	0
Protocolo D	Cotiledones	+	i, es	7.7	1
	Hipocotilo	+	i	0	0
	Radícula	+	i	0	0
	Peciolo	+		0	0

Respuesta = No. de callos con embriones/ no. de callos total, en porcentaje; Rendimiento = promedio de embriones por callo; i = puntos verde claro en callo, inducción a embriogénesis; es = embriones somáticos al menos en estado globular.

Formación de callo y respuesta embriogénica de la variedad A 70-34  
 Tabla 21. de alfalfa en cultivo de tejidos.

	Inóculo	Formación de callo	Observaciones de los callos	Respuesta %	Rendimiento
Protocolo A	Cotiledones	+		0	0
	Hipocotilo	+		0	0
	Radícula	+		0	0
	Peciolo	+	ant, es	10	2
Protocolo B	Cotiledones	+		0	0
	Hipocotilo	+		0	0
	Radícula	+		0	0
	Peciolo	+	av	0	0
Protocolo C	Cotiledones	+	es	100	7
	Hipocotilo	+	es	100	7
	Radícula	+	es	80	5
	Peciolo	+	es	100	16
Protocolo D	Cotiledones	+	es, î	20	15
	Hipocotilo	+	es, î	0	0
	Radícula	+	es, i	20	6
	Peciolo	+	es,	10	2

Respuesta = No. de callos con embriones/ no. de callos totales, en porcentaje; Rendimiento = promedio de embriones por callo; av = áreas verde claro en callo; ant = antocianinas; es = embriones somáticos al menos en estado globular; î = inducción a embriogénesis, puntos verde claro internos.

llos de cotiledones, radícula y de peciolo, aunque la respuesta fué menor que para el protocolo anterior y un rendimiento similar al obtenido en dicho protocolo C. Aquí se obtuvieron un total de 58 embriones somáticos. Los callos fueron de tamaño pequeño y mediano, color crema, algunos con tonos verde claro o verde intenso, brillantes y friables. El 95% de los callos de tejidos embrionarios, igualmente, mostró puntos verde claro internos que al microscopio se observaron aún disgregados, la menor parte de los cuales culminó en embriones. Fué sorprendente la respuesta de esta línea A 70-34 bajo este protocolo. Los embriones obtenidos tanto de los protocolos A, C y D tuvieron en su mayoría un desarrollo anormal, sin embargo, si se logró que algunos de estos se desarrollaran en plantas completas.

En la tabla 22 se resumen de manera general los resultados obtenidos al emplear los cuatro diferentes protocolos de trabajo en los cultivos de las diez variedades de alfalfa.

Entre todas las observaciones se deja entrever, por una parte, que este material de *M. sativa* forma callo en cultivo y al menos 7 variedades mostraron en sus callos características similares a las de un callo embriogénico, es decir, se interpreta esto como una inducción positiva hacia la embriogénesis; y por otro lado que en 5 de las variedades, excluyendo a la línea embriogénica A 70-34, mostraron embriones somáticos, aunque en baja proporción, lo cual depende de el genotipo y de su interacción con el tipo de medio de cultivo y de la concentración de los reguladores del crecimiento.

En relación al porcentaje de callos embriogénicos ó potencial de regeneración de cada variedad y de acuerdo a los reportes previos de varios autores, se considera que las variedades como las que se emplearon en este trabajo es material de baja regeneración a plantas en cultivo. En la tabla 23a se registran los resultados para todas las variedades como su respuesta embriogénica, rendimiento y los protocolos de cultivo en los que se observó esta respuesta. Esta cuantificación nos permite resaltar que variedades formaron embriones somáticos. Observamos que el mayor porcentaje de respuesta embriogénica fué del 10%, lo cual resulta comparable con los resultados de trabajos similares. En lo tocante al rendimiento, el valor más alto fué para Velluda Peruana con 12 embriones por callo en promedio superando el valor de A 70-34 con 8 embriones promedio por callo y al resto de las variedades. Esto nos habla de que un genotipo que muestra tanto respuesta embriogénica como buenos rendimientos pueda ser seleccionado para optimizar su respuesta tanto cuantitativa como cualitativamente y así establecer una línea embriogénica en cultivo de tejidos. Finalmente, los protocolos de cultivo

Tabla No. 22. Resultados obtenidos bajo cuatro protocolos de cultivo, diferentes tipos de inóculo y para 10 variedades de alfalfa *Medicago* spp. y la obtención de embriones somáticos.

Protocolo		A				B				C				D			
Variedad	Inóculo	C	H	R	PEC	C	H	R	PEC	C	H	R	PEC	C	H	R	PEC
Puebla 76										i							
INIA 76					i					i							
Velluda Peruana					es								i				es, i
Moapa 69					es												es
Sintético I Jar.										i			es				es
Sintético II Hgo.									es				i				i
San Joaquín II																	
Bajío 76					i				i								i
Valenciana																	es, i
A 70-34					es					es			es				es es

C = cotiledones; H = hipocotilo; R = radícula; PEC = peciolo; i = inducción a embriogénesis somática; es = embriones somáticos observados.

en los que se observó la aparición de los embriones somáticos fueron: en el protocolo D para 5 variedades; protocolo A para 3 variedades; protocolo C para 2 variedades y protocolo B para una variedad. En la tabla 23b se anota el potencial embriogénico de algunas variedades sobresalientes reportadas en la literatura. Sobresale el hecho de que algunas de estas fueron empleadas por dos o más grupos de trabajo y se advierte las diferencias entre uno y otro en la respuesta. También se observa que la respuesta de Saranac fué inicialmente de 5%, resultado posteriormente aumentado al seleccionar clonas embriogénicas como Regen S y RA 3. Estos resultados hacen en cierta forma comparables los porcentajes obtenidos en este trabajo. Para optimizar la respuesta embriogénica, estos autores también probaron diferentes formulaciones de medios de cultivo y niveles de reguladores del crecimiento. Ladak, Norseman, Vernal y Heinrichs son material embriogénico al igual que Ranglander a partir del cual se seleccionó a la línea A 70-34.

#### OBTENCION Y DESARROLLO DE EMBRIONES SOMATICOS.

Hasta ahora se han mencionado los resultados de los cultivos de cada variedad y el potencial de regeneración de embriogénesis observado. Si bien es importante describir la cantidad de embriones somáticos obtenidos, igualmente lo es verificar la calidad de los mismos, es decir, el desarrollo final a través de las etapas de la embriogénesis y su conversión a plantas.

En las figuras 8 y 9 se esquematiza con un diagrama de barras la respuesta embriogénica de cada una de las variedades y el número de embriones de cada una de éstas. Se observa que la línea embriogénica A 70-34 regenera a plantas en tres de los protocolos, sin embargo, el número de embriones es variable: para el protocolo C se obtuvieron más de 350 embriones, en cambio, para el protocolo A y D fué en mucho menor cantidad. De las variedades probadas destacaron Velluda Peruana y Moapa 69. Embriones somáticos en menor cantidad se observaron en Sintético II Hidalgo, Valenciana y Sintético I Jardín. Estos resultados muestran que de todos los tipos de inóculo se observó alguna vez la formación de embriones somáticos, presentándose con mayor frecuencia en cotiledones, seguido de hipocotilo y peciolo y por último en raíz.

En seis de las diez variedades trabajadas se logró regeneración a embriones somáticos al menos en estado globular o torpedo y embriones de A 70-34 llegaron a desarrollarse en plantas completas. Desde los reportes de Kao y Michayluk (1980), Novak y Konecna (1982), Luppotto (1983), Atanassov y Brown en 1984, Nagarajan y coautores (1986), Nagarajan y Walton (1987) hasta Meijer y Brown (1987b), mencionan haber observado anomalías fenotípicas en los embriones somáticos. En este trabajo los resultados fueron semejantes, a excepción de los

Tabla No. 23a Cuantificación de la respuesta embriogénica, rendimiento y protocolos de cultivo en los que se observó embriogénesis somática en variedades de alfalfa Medicago spp. que se cultivan en México.  
\* A 70-34 como control para este trabajo.

	Respuesta embriogénica (%)	Rendimiento	Protocolos de cultivo
Puebla 76	0	0	
INIA 76	0	0	
Bajío 76	0	0	
Sintético I Jard.	4	1.0	D
Sintético II Hgo.	10	2.0	B y C
Moapa 69	10	2.0	A y D
San Joaquín II	0	0	
Velluda Peruana	4 - 10	12.0	A y D
Valenciana	7.7	1.0	D
A 70-34*	10 - 100	8.0	A, C y D

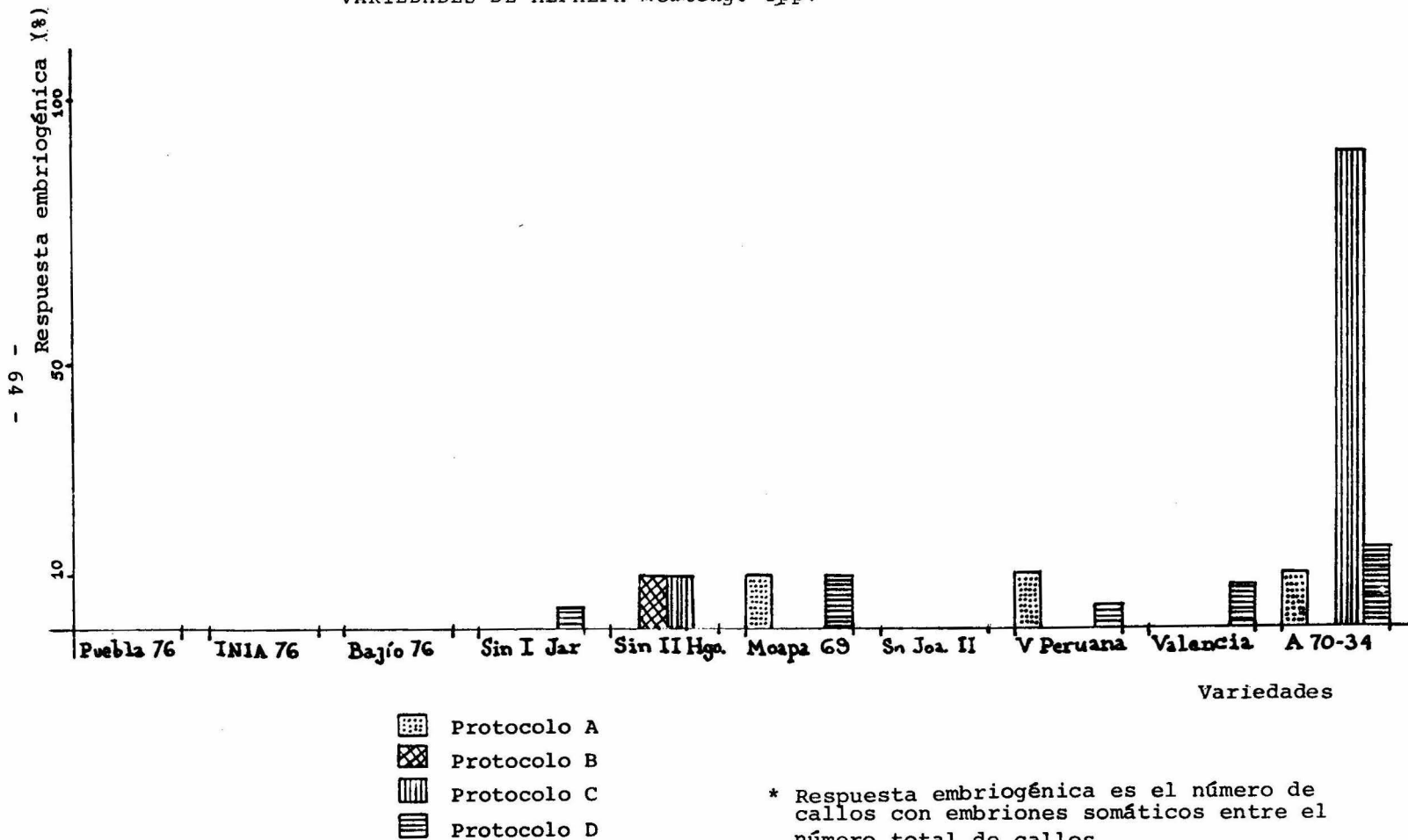
Respuesta embriogénica = no. de callos con embriones/ no. total de callos  
Rendimiento = no. de embriones por callo en promedio.

Tabla No. 23b . Respuesta embriogénica reportada para algunas variedades de alfalfa Medicago spp.

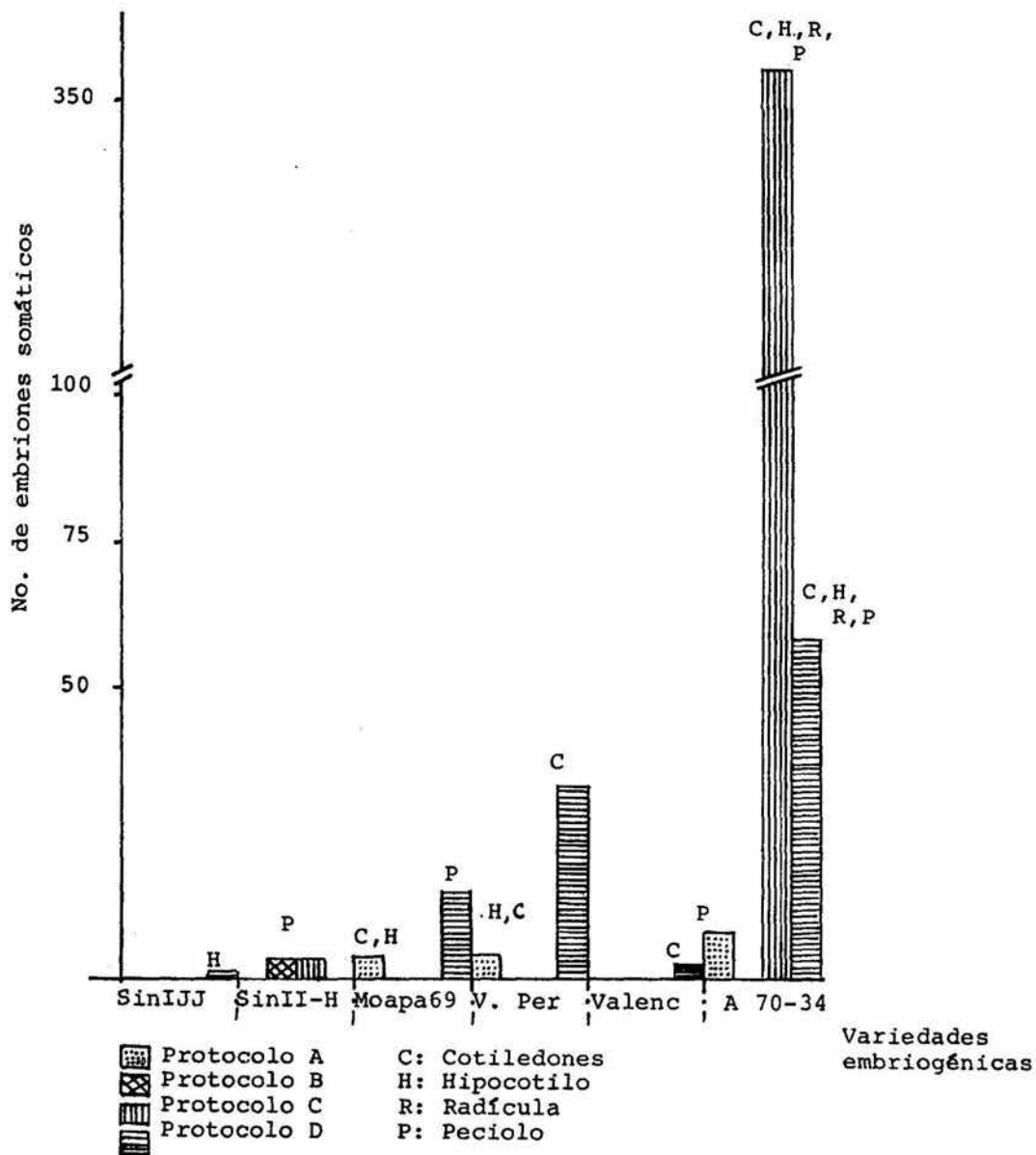
Variedad	Respuesta	Referencia
Saranac	0 a 5%	Saunders y Bingham, 1975
	20%	Brown y Atanassov, 1985
Regen S	67%	Bingham et. al., 1975
	48%	Brown y Atanassov, 1985
RA 3	100%	Walker et. al., 1981
Ladak	82%	Mitten et. al., 1984
	9%	Brown y Atanassov, 1985
Norseman	46%	Mitten et. al., 1984
Rangelander	80%	Brown y Atanassov, 1985
Vernal	41%	Brown y Atanassov, 1985
Heinrichs	62%	Nagarajan et. al., 1986



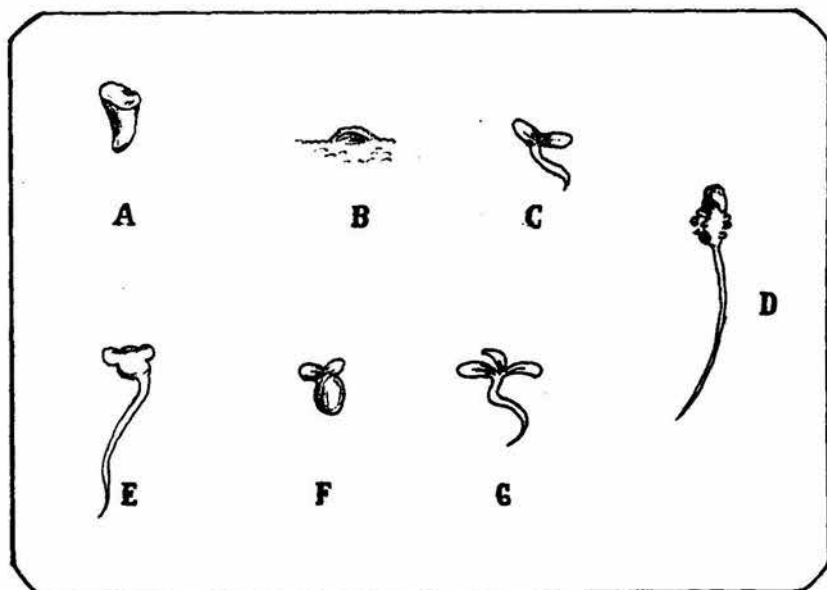
REPRESENTACION GRAFICA DE LA RESPUESTA EMBRIOGENICA PARA DIFERENTES  
 VARIEDADES DE ALFALFA *Medicago spp.*



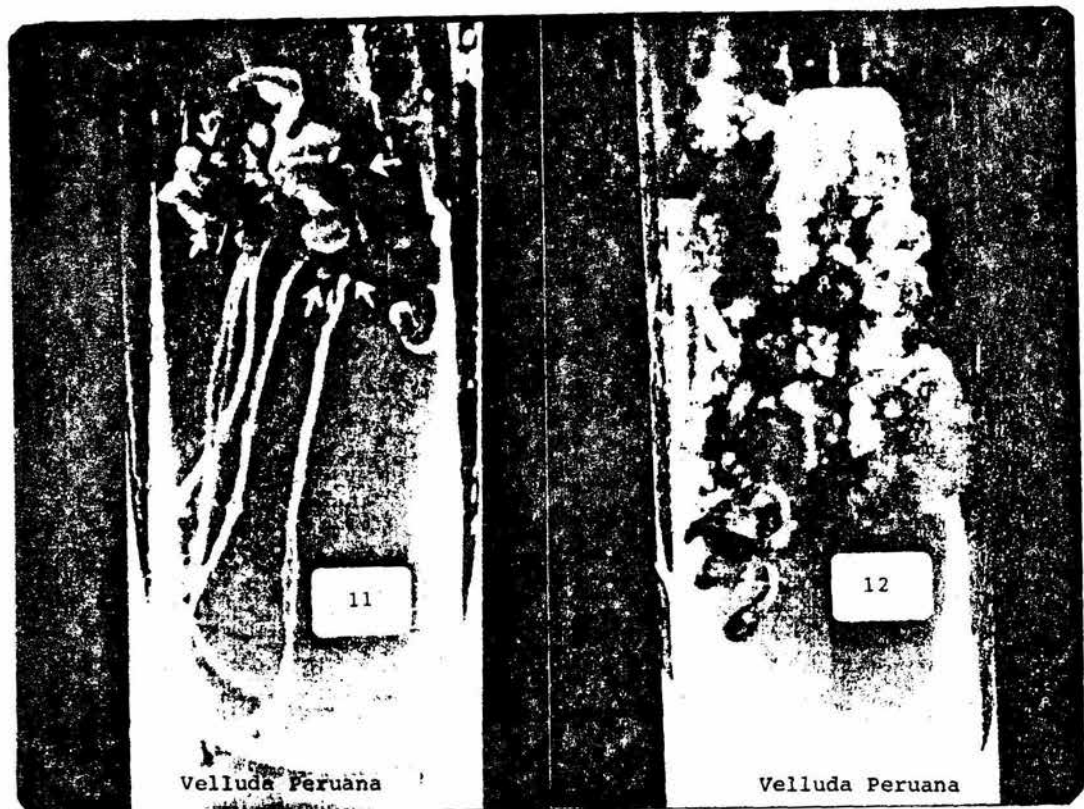
REPRESENTACION DEL NUMERO DE EMBRIONES SOMATICOS TOTAL OBTENIDOS EN CADA PROTOCOLO DE CULTIVO PARA DIFERENTES VARIEDADES EMBRIOGENICAS DE *Medicago* spp.



embriones de A 70-34, no fué posible lograr que los embriones obtenidos y rescatados se desarrollaran en plantas normales y completas. Algunas malformaciones similares a las que se reportan fueron: embriones en estado globular que re-vertieron a callo, otros con cotiledones fusionados, o bien algunos que sí alcanzaron a desarrollarse hasta la etapa torpedado pero que no germinaron; embriones con hipocotilo no desarrollado; o bien con radícula rudimentaria; o con radícula bien desarrollada mas no así el polo meristemático apical (epicotilo); embriones con tres cotiledones e incluso embriones globulares secundarios desarrollados de un hipocotilo rudimentario de embriones somáticos que no se desarrollaron en plantas. En la figura 10 se esquematan algunos de estos embriones anormales.



- (A) Cotiledones fusionados
- (B) Embriones globulares que encallecieron nuevamente
- (C) Plántulas con hipocotilo muy corto
- (D) Embriones secundarios originados del hipocotilo de un embrión anormal
- (E) Desarrollo de raíz, no de epicotilo
- (F) Embriones que no germinaron
- (G) Embriones con tres cotiledones en vez de dos.



En las figuras 11 a 14 se puede observar la morfología de algunos de los embriones somáticos obtenidos.

Fig. 11 Muestra cuatro embriones somáticos en el medio de con versión ("germinación") y que después de una semana desarrollaron sistema radicular, no así el meristemo apical, el cual se observa como estructuras globulares con cotiledones rudimentarios, hipocótilo engrosado y pérdida del color verde, después de unos días más se observó la aparición de nuevos embriones globulares emergiendo de los hipocótilos engrosados (→).

Fig. 12 Aquí se observa que los embriones resembrados formaron callo en lugar de raíces y en la foto se muestra un embrión con tres cotiledones en lugar de dos.



Fig. 13 Embriones de A 70-34 que no formaron raíces, solamente callo en el polo radicular y se observan algunos hipocotilos ( H ) y cotiledones fusionados ( C1 ) o malformados ( C2 ).

Fig. 14 En esta figura se muestra el desarrollo de algunas plantas en los cultivos. Estas plantas normales lograr formar un buen crecimiento de sus raíces y brotes.

## VI. DISCUSION

Este trabajo consistió en un monitoreo de germoplasma de alfalfa y su respuesta embriogénica en cultivo. De los resultados expuestos anteriormente sobresalen varios aspectos a discusión de los cuales el factor genotipo resultó ser fundamental en la interpretación de los resultados.

En comparación con los trabajos de otros autores en alfalfa, los genotipos empleados en este estudio se considera que poseen una baja respuesta embriogénica en cultivo, y al igual que Reisch y Bingham (1980) y Brown y Atanassov (1985) no se encontró una relación directa entre la respuesta embriogénica y la formación y producción de callo, es decir, que una buena producción de callo no constituye un prerequisite para obtener una respuesta de regeneración alta (Brown y Atanassov, 1985). En este estudio, en principio, en todos los tipos de inóculos se observó la formación de callo muchos de los cuales no formaron embriones somáticos.

Por otro lado Saunders y Bingham (1972), Walker *et al.* (1978), Kao y Michayluk (1980), Novak y Konecna (1982), Lupotto (1983), Atanassov y Brown (1984) y Meijer y Brown (1987a), encuentran diferentes tipos de callo y variación de la respuesta embriogénica aún entre planta y planta de una misma variedad. En este trabajo se corrobora esta variación intervarietal e intravarietal, lo cual no resulta asombroso si se considera que la alfalfa es una especie de polinización abierta y que la variedad *per de* es una población altamente heterogénea (Kao y Michayluk, 1980). Así, detectamos callos de diferente tamaño relativo, distinta consistencia y color e inclusive los hubo con pigmentación púrpura a causa de antocianinas.

A pesar de que el potencial embriogénico de las variedades probadas resultó ser menor a otras reportadas en los trabajos de alfalfa, también se detectaron callos con una inducción positiva hacia la embriogénesis, ya que se observaron callos con puntos presumiblemente meristemáticos, color verde claro, embebidos, en seis variedades: Puebla 76, INIA 76, Velluda Peruana, Sintético I Jardín, Sintético II Hidalgo, Valenciana y A 70-34 bajo los protocolos de cultivo A, B, C y D. Estas áreas o puntos meristemáticos en su mayoría no culminaron en embriones somáticos. De hecho Novak y Konecna (1982) y Lupotto (1983) reportan haber observado áreas verde claro en algunos de sus callos. dosSantos *et al.* (1980) reportan que algunas áreas verde claro precedieron a la formación de brotes y embrioides y Mitten y coautores (1984) concluyen que estas áreas verdes seniororganizadas detectadas en algunas variedades probadas significan material con un bajo potencial embriogénico para aquellos genotipos que las poseen.

En relación al efecto de los protocolos de cultivo en la respuesta de regeneración *in vitro*, Walker, Yu, Sato y Jaworsky (1978) infieren que el tipo de órgano formado durante la organogénesis de alfalfa puede estar controlado por la manipulación de los componentes nutricionales del medio de cultivo. Kao y Michayluk (1981) igualmente establecen que las sales minerales de los medios pueden afectar a la embriogénesis y que por lo tanto debe hacerse un ajuste adecuado del nivel de hormonas y la concentración de sales minerales. Previamente Saunders y Bingham (1972), señalaron que la regeneración de plantas en cultivo está condicionada por la interacción de los medios de inducción y de diferenciación con el genotipo y con los reguladores del crecimiento. Recientemente Brown y Atanassov (1985) apoyan este punto al mencionar que existe evidencia de la influencia del tipo de protocolo de cultivo con respecto a la regeneración *in vitro*. Estos autores concluyen que el tipo de protocolo del cual obtuvieron mejores resultados, no fué el más conveniente para líneas de baja respuesta a diferencia de las líneas de alta respuesta con germoplasma parental *falcata* con las que obtuvieron altos rendimientos de embriones somáticos.

Ammirato y Steward (1971, Tisserat *et al.*, 1979) mencionan que en niveles altos de nutrientes en los medios de cultivo como en un MS, se logran desarrollar los embriones somáticos. En este estudio, los cuatro protocolos de cultivo manejan niveles altos de sales inorgánicas, cada uno de ellos modificado en cuanto al nivel de nitrógeno total y con los cuales se han obtenido embriones somáticos en alta respuesta. El efecto de cada uno de estos protocolos de cultivo reveló lo siguiente: respuesta embriogénica para el protocolo A de Moapa 69, Velluda Peruana y A 70-34 e inducción a embriogénesis de las variedades INIA 76 y Bajío 76. Este protocolo maneja un medio basal MS ampliamente socorrido para el cultivo de tejidos vegetales y que para embriogénesis en alfalfa fué modificado (Meijer y Brown, 1987b). Este protocolo maneja un medio de inducción por diez días y un medio de regeneración sin reguladores del crecimiento. Este tipo de medio basal modificado también resultó favorable en los experimentos alternos realizados con Velluda Peruana y Moapa 69, donde la concentración de reguladores del crecimiento bajo los cuales se formaron los embriones somáticos indican que la inducción fué positiva, por lo cual no es necesario modificar significativamente la concentración hormonal que reporta originalmente el protocolo A. Para el protocolo B se esperaba una respuesta embriogénica mayor dado que este protocolo fué establecido para una línea embriogénica de *M. sativa*. Sólo se observó la formación de embriones somáticos en Sintético II Hidalgo y prácticamente no se observaron callos con inducción a embriogénesis en ninguna variedad. Walker *et al.* (1978, 1979) modificaron el medio original de Schenk y Hildebrandt en la cantidad y calidad de fuente de nitrógeno. Al respecto Skokut *et al.* (1980) hacen una comparación de algunos medios basales y resaltan que



el medio SH basal contiene de 79 a 87% menos ion amonio que los medios basales de Blaydes y de Linsmaier y Skoog. A pesar de haber empleado el SH modificado por Walker y coautores (1981), para el germoplasma que empleamos, este no resultó favorable en lo referente a respuesta embriogénica. Este protocolo B maneja una primera etapa de proliferación de callo con ANA y cinetina, una corta etapa de inducción con 2,4-D y finalmente la regeneración o diferenciación en un medio basal. Se observó que al someter a los inóculos directamente a la formación de callo este resultaba ser demasiado proliferativo. Bajo el protocolo C sólo se observó la formación de embriones en Sintético II Hidalgo y en A 70-34 e inducción en seis variedades, lo cual nos induce que la regeneración de los embriones es el punto clave. Este protocolo no maneja una resiembra a un medio basal para permitir morfogénesis. El protocolo D maneja un medio basal Bli2Y con tres pasos. Este medio modificado por Bingham y colaboradores (1975) fué empleado favorablemente en trabajos en los que seleccionaron material que regenerara a plantas en cultivo, y dentro de los trabajos de alfalfa ha sido ampliamente utilizado como un medio muy generalizado. Bingham y coautores reportan haber suplementado a este medio con inositol un compuesto orgánico que se ha visto que está involucrado en la síntesis de fosfolípidos, pectinas de pared celular y en sistemas de membrana citoplasmática (Conger, 1980), y con extracto de levadura que es un compuesto orgánico de composición indefinida pero que posee componentes de bajo peso molecular con una estructura similar a auxinas, con el cual Bingham obtiene mejores rendimientos en Regen S. Bajo el protocolo D se obtuvieron embriones somáticos en Velluda Peruana, Moapa 69, Sintético I Jardín, Valenciana y A 70-34 y asimismo se observó inducción a embriogénesis en Velluda Peruana, Sintético II Hidalgo, Bajío 76 y Valenciana. Estos resultados nos sugieren que este protocolo resultó ser favorable para nuestras variedades. Este protocolo maneja un periodo de inducción durante diez días en oscuridad. Novak y Konecna (1982) no explican el efecto fisiológico real de esta especificación, sin embargo, se infiere que si el proceso natural de los primeros estadios ocurre en oscuridad este sea el propósito de someter a los inóculos a oscuridad, en donde estén involucrados procesos de activación o desactivación de fitocromo. Poco se ha estudiado el efecto de la luz en el proceso de embriogénesis somática en alfalfa, tal vez porque no es un factor crítico en estos sistemas. Al respecto Saunders y Bingham (1972) sometieron a sus cultivos a oscuridad, iluminación continua y fotoperiodo de 16h luz/8h oscuridad y observaron que no existía una diferencia fundamental entre las tres condiciones probadas concluyendo que tanto la inducción de callos como la obtención de brotes, no se veía afectada por el fotoperiodo. Lupotto (1983) en el reporte de sus trabajos menciona que la iluminación no tuvo influencia en la inducción de callo, aunque sí observó que promovió la proliferación de callo en los subcultivos. Este mismo protocolo D



en la segunda fase de desarrollo de callo también determina la formación de los embriones somáticos, esta respuesta probablemente se ve reforzada por la cinetina, al activar la división celular de los centros meristemáticos previamente inducidos. La búsqueda de un medio basal adecuado condicionó a que varios autores probaran diferentes tipos de formulaciones. Walker y Sato (1981) encontraron algunas diferencias substanciales entre los medios de Blaydes y SH en la concentración de potasio, magnesio, sulfato y calcio así como en la composición de sales menores y en la fracción orgánica por lo que realizaron una serie de combinaciones de sales mayores, menores y vitaminas de ambos tipos de formulaciones y obtener a aquella combinación más rendidora. Aunque Stavarek *et al.* (1980) concluyeron previamente que el tipo de medio basal empleado para la obtención de brotes no parece ser crítico, Luppotto (1983) encontró que el medio basal que le dió mejores resultados tanto para inducción como para regeneración fué el B5.

Entre los elementos orgánicos que se emplearon dentro de las formulaciones manejadas para este trabajo, también sobresalen algunos aspectos importantes. La sacarosa es uno de ellos empleada para reemplazar el carbono que normalmente la planta fija de la atmósfera, de tal forma que el papel de este carbohidrato en los cultivos es como una fuente de energía al participar en la glicólisis, el ciclo de ácidos tricarboxílicos y en la vía de las pentosas, y como un osmorregulador. (Bares y Umiel y Brown *et al.* citados por Stavarek *et al.*, 1980). Estos autores mencionan que en callos de tabaco, una tercera parte de la sacarosa adicionada al medio de cultivo es empleada como osmorregulador y las dos terceras partes restantes como fuente de energía. Sugieren, asimismo, que su papel como osmorregulador es más intenso durante la etapa de desarrollo de los brotes que durante el período de inducción. En este trabajo se empleó de manera general una concentración de 3% de sacarosa en los medios de cultivo, basados en los protocolos establecidos por sus autores. Meijer y Brown (1987a) de acuerdo a su experiencia concluyen que el nivel de sacarosa corrientemente empleado de 3% (0.9M) en el medio de cultivo, dá óptimos resultados en cuanto a rendimiento y que por lo tanto no existe razón alguna para modificarlo, en tanto que a altas o a bajas concentraciones de sacarosa se inhibe el proceso de embriogénesis somática.

Otro elemento importante es el extracto de levadura, un complejo orgánico elaborado por la extracción acuosa de células de levadura autolisadas y que de acuerdo a su análisis físico-químico presenta un alto contenido de vitamina B y 7.4% de nitrógeno total. Aunque como Bingham y colaboradores (1975) y Saunders y Bingham (1972, 1975) observan que el medio suplementado con extracto de levadura favoreció sus cultivos al observar "un brotamiento de manera espectacular", Walker y Sato en 1981 y Luppotto (1983) mencionan que el Bli2Y es un buen medio

de regeneración a embriones, pero considerar que bien puede eliminarse este complejo del medio de cultivo sin que esto afecte adversamente la embriogénesis y observan también que la formación de raíces se ve inhibida por la presencia del extracto de levadura en el medio de regeneración. En los resultados del presente estudio el efecto real del extracto de levadura no resulta concluyente. Se siguió el protocolo de cultivo establecido por sus autores pero no se comprobó el efecto de este complejo en las fases de inducción y regeneración para el germaplasma que nosotros empleamos. Para realizar estos experimentos se requiere, en principio, detectar material con potencial embriogénico y posteriormente realizar la optimización de las condiciones generales del cultivo. Al menos en el protocolo D, que maneja un Bli2Y, sí se obtuvieron embriones somáticos aunque a bajos rendimientos y no con la calidad deseada, es decir, que mostraron anomalías morfológicas, pero no sabemos con precisión el efecto del extracto de levadura en nuestros resultados. Lo mismo puede decirse del hidrolizado de caseína. Este es un complejo orgánico compuesto de aminoácidos entre los que predominan la glutamina y la prolina como Meijer y Brown (1987a) mencionan. La idea de adicionar caseína hidrolizada a los medios de cultivo es que como fuente de nitrógeno orgánico ayuda a reforzar la cantidad y calidad de los embriones somáticos. Acerca de los favorables efectos que especialmente tienen la glutamina y la prolina en genotipos embriogénicos hablan los trabajos de de Stuart y Strickland (1984a, 1984b), Skokut *et al.* (1985) y Meijer y Brown (1987a, 1987b). Al parecer los aminoácidos constituyen una fuente inmediata de nitrógeno a los cultivos. En este trabajo sólo para el protocolo B se incluyó el hidrolizado de caseína como fuente de aminoácidos, sin embargo, se observó la formación de embriones en mínima cantidad. Cabe recordar nuevamente la influencia del genotipo en la respuesta embriogénica. Skokut *et al.* (1985) concluyen que el suministro de aminoácidos refuerza la cantidad y calidad de los embriones somáticos, pero la incorporación del nitrógeno proveniente de estos aminoácidos en la síntesis de proteínas es independiente del genotipo.

Steward y Krikorian citados por dos Santos y coautores en 1980, enuncian que la embriogénesis somática es un proceso secuencial que requiere de un período de cultivo en el que las células inician su propensión morfogenética seguida de un período en el cual su potencial embriogénico sea expresado. Este proceso secuencial se ha logrado diferenciar en dos pasos fundamentales, el de inducción y el segundo paso donde ocurre la diferenciación. Walker *et al.* (1981) de acuerdo a sus resultados obtenidos después de haber trabajado con diferentes tipos de medios de regeneración como B5, SH, Bli2Y y LS, concluyen que la determinación del tipo de órgano formado es función única de los reguladores del crecimiento incluidos en el medio de inducción y que el tipo de morfogénesis sólo es observable en el medio de regeneración. El medio de regeneración generalmente se maneja como un medio basal sin reguladores del

crecimiento, sin embargo, en este trabajo se observó que la regeneración de Velluda Peruana (callos de peciolo bajo el protocolo A) y Valenciana (callos de cotiledones y radícula bajo el protocolo B) no favoreció las cualidades de los callos ni se observó la formación de embriones somáticos. Los callos se tornaron muy amarillos o en ocasiones a color claro en el área de contacto con el medio de cultivo. En cambio en el protocolo D, se observó que la respuesta embriogénica de los callos que así se llegó a observar fué en el segundo medio de cultivo con ANA y cinetina alrededor del día 15 de su resiembra para las variedades A 70-34, Velluda Peruana, Moapa 69, Valenciana y Sintético I Jardín. En callos embriogénicos de A 70-34 que cubrieron totalmente el protocolo D y que ya no siguieron formando más embriones somáticos, fueron sembrados de nuevo a este segundo medio de cultivo y se logró regenerar más embriones somáticos. Por todo lo anterior se deduce que el medio de regeneración juega un papel muy importante en la formación de los embriones somáticos. En seis de nuestras variedades se ha observado que la inducción de embriogénesis está dada, ahora será necesario optimizar las condiciones de regeneración y desarrollo de los embriones somáticos.

La inducción positiva hacia la embriogénesis que aquí se reporta luego de observar estos puntos verde claro embebidos en los callos, se detectó bajo el protocolo C, D y A. La mayor parte de estos puntos no se desarrolló completamente y pensamos que en este punto influyó el medio de regeneración y/o la calidad de los reguladores del crecimiento. En cuanto a los reguladores del crecimiento, no cabe duda que el 2,4-D funge un papel imprescindible como agente inductor de la embriogénesis somática, aunque como mencionan Bingham y colaboradores (1975), los niveles óptimos de hormona durante la embriogénesis se desconocen; sin embargo, se ha observado que altos niveles de 2,4-D promueven la embriogénesis durante estados preglobulares, aunque si se mantienen estos altos niveles se inhibe el desarrollo ulterior e incluso se favorece a que aquellos embriones ya formados retornen a formar callo. Walker *et al.* (1979) puntualizan que el requerimiento del 2,4-D en el cultivo y su subsecuente remoción para inducción-diferenciación, habla de la dualidad de la función de este compuesto en cultivo de tejidos. Halperin (1966) propuso que el 2,4-D mantiene al cultivo en un estado desorganizado por una continua estimulación celular. Murashige citado por Walker y coautores (1978) puntualiza que este regulador del crecimiento estimula la proliferación del callo *in vitro* y que es un antagonista de la organogénesis por lo que el patrón de formación de órganos es el resultado de los niveles endógenos de hormonas auxina y cinetina, aún así no se ha determinado el efecto de los reguladores del crecimiento en el patrón de la formación de

órganos. Bingham *et al.* (1975) infieren que el 2,4-D estimula la síntesis de citocinina interna de tal manera que es así como se induce la formación de brotes. Walker *et al.* (1978) mencionan un efecto residual del 2,4-D en el medio sin hormonas y un efecto de choque ("shock") provocado por la alteración del balance normal de manera drástica durante la etapa de inducción en donde se provoca este "disparo" hacia la diferenciación. Aunado a todas estas consideraciones acerca del 2,4-D, Meijer y Brown en 1987b, mencionan que esta auxina sintética puede provocar alteraciones cromosómicas en especial durante exposiciones prolongadas además de que puede provocar malformaciones en la capacidad regenerativa de los cultivos. En este trabajo se manejaron concentraciones del 2,4-D desde 5µM hasta 100µM y el período de exposición para este agente fué desde 4 días en el protocolo B hasta 30 días en el protocolo C, con 10 días para los protocolos A y D. La relación de tiempo y concentración de este agente inductor y la observación de una inducción positiva pero baja regeneración no resulta tampoco concluyente, sin embargo no podemos descartar la posibilidad de que la morfogénesis no haya sido evidente por la influencia del 2,4-D. En los protocolos en los que se observó la formación de embriones, existen diferencias substanciales en cuanto a la concentración del 2,4-D, aunque su influencia en la calidad no es precisa. Meijer y Brown al respecto, observan que la pobre calidad de los embriones se correlaciona directamente con altas concentraciones de esta auxina sintética. Kao y Michayluk en 1981 reportan que el fenómeno de inducción no es específico del 2,4-D, mencionan que el ANA puede reemplazarlo en ocasiones, siendo este el único reporte que así lo expresa. Meijer y Brown en 1987b no encontraron respuesta embriogénica con ANA ni con picloram (ac. 4 amino 3,5,6 tricloropicolínico) que es otra auxina sintética. Bingham *et al.* (1975) observan que al emplear ANA se obtiene un mínimo efecto en la formación de brotes y mencionan la posibilidad de que el 2,4-D y el ANA puedan tener efectos en la síntesis o disminución de auxinas naturales que no hayan sido eliminados. Luppotto (1983) sostiene que el ANA mantiene el crecimiento del callo en alfalfa. Para Novak y Konecna la presencia de ANA y cinetina simultáneamente en el medio de cultivo permite el establecimiento de callos a largo plazo y permite el desarrollo y diferenciación de los embriones tal y como lo observamos en este trabajo bajo el protocolo D. La cinetina no se requiere para inducir la brotación, pero sí para favorecer la formación de brotes en los cultivos (Bingham *et al.*, 1975). De acuerdo con Tisserat y coautores, se concluye que la influencia del balance auxina citocinina juega un papel esencial en el control de la embriogénesis somática. En este trabajo se emplearon niveles de ANA desde 1µM hasta 10µM y de cinetina desde 1µM hasta 10µM, niveles dentro de los que se contempló la inducción y formación de embriones somáticos. En los experimentos alternos con Ve-

lluda Peruana y Moapa 69 que incluyeron diferentes niveles de citocinina en combinación con 2,4-D se observó que a niveles de 0.1mg/l a 0.2 mg/l de citocininas favorecen la embriogénesis, en cambio, a niveles mayores, se observó una tendencia hacia la rizogénesis de callos.

En lo concerniente al tipo de inóculo, en general tanto tejidos embrionarios como peciolo produjeron callo y se verificó la formación de embriones somáticos. De acuerdo al tipo de callo y embriones formados los mejores inóculos fueron hipocotilo y peciolo, cuyos callos no fueron demasiado proliferativos, en callos de cotiledones y de hoja trifoliada (resultados no reportados) se observó esta tendencia a crecer en demasía y callos de radícula suelen ser desde pequeños o muy grandes y friables. La ventaja de los inóculos procedentes de tejidos embrionarios es que son tejidos súmacamente jóvenes por lo que existe mayor probabilidad de inducir y diferenciarlos por embriogénesis somática. Sin embargo emplear tejidos embrionarios implica partir siempre de semilla considerando la variabilidad inherente en este material, no garantizando plenamente la respuesta embriogénica y su rendimiento, por lo que se deben sembrar grandes cantidades de semilla y seleccionar así el material con el que se pretende trabajar. También se debe contar con un buen sistema de desinfestación del material vegetal que para este trabajo el empleado no fué eficiente en dos variedades lo cual impidió completar los protocolos de cultivo. La ventaja del manejo de peciolos, es que se parte de una planta conocida, se pueden obtener varios inóculos para una siembra para una siembra y es material que se puede clonar continuamente de tal forma que se dispone de éste para siembras futuras. El empleo de peciolos de plantas de invernadero es igualmente ventajoso, solamente debe adecuarse un sistema de desinfestación eficiente. Las plantas mantenidas en cultivo aséplicas, deben tener las condiciones apropiadas de luz, temperatura, medio de cultivo como fuente de nutrientes y el tipo de recipiente adecuado para permitir su óptimo desarrollo. Se dió el caso que plantas de A 70-34 bajo nuestras condiciones físicas desarrollaron peciolos delgados que no resultaron ser muy convenientes para el establecimiento de los cultivos, observando igualmente que las plantas clonadas tardaron mucho más tiempo en recuperarse y desarrollar su sistema radicular que para el resto de las variedades probadas. En cambio el desarrollo de las plantas de invernadero es mucho mayor, aunque, debe considerarse el aspecto fitosanitario de la planta, se deben emplear plantas sanas, que no estén en floración y que sus tejidos se observen vigorosos. Este punto se refleja en las observaciones de Tisserat *et al.* (1979) quienes mencionan que el inóculo y algunas de sus cualidades fisiológicas son de gran importancia en la determinación del proceso de embriogénesis somática. Novak y Konecna (1982) en sus trabajos reportan que la capacidad embriogénica de los cultivos puede darse a partir de varios órganos y que es variable entre sí, lo cual se corrobora en este estudio.



Luppotto (1983) al respecto concluye que la importancia del tipo de inóculo y su estado fisiológico son aspectos determinantes en las vías particulares de desarrollo dentro del cultivo de tejidos vegetales.

En la obtención y desarrollo de los embriones somáticos se determinó tanto el aspecto cuantitativo como el cualitativo. De acuerdo al número total de embriones obtenido por variedad se observó el siguiente orden decreciente: A 70-34, Velluda Peruana, Moapa 69, Sintético II Hidalgo, Valenciana y Sintético I Jardín, aunque en términos del rendimiento, el mayor promedio de embriones por callo se obtuvo con la variedad Velluda Peruana seguida de A 70-34 y el resto de las variedades en el mismo orden decreciente que para número total de embriones. Con Velluda Peruana se obtuvo un rendimiento de 12 embriones por callo, lo cual se explica si se considera que uno de los genotipos probados resultó ser embriogénico de tal forma que aumentó el rendimiento por variedad, aunque el número total de embriones de Velluda Peruana fué de 33, a diferencia de los 421 embriones de A 70-34, pero de un rendimiento de 8 embriones por callo en promedio. Nuestros resultados muestran potenciales de regeneración para las variedades probadas del orden del 4-10% en cinco variedades, lo cual consideramos que es prometedor, pues al igual que en trabajos similares se puede lograr aumentar los porcentajes de respuesta embriogénica, si se selecciona a este material que mostró embriogénesis somática y se procede a realizar algunas pruebas de optimización de los medios de cultivo. La obtención de embriones somáticos de acuerdo a los protocolos de cultivo fué protocolo D, en 4 variedades; protocolo A en 3 variedades; protocolo C en 2 variedades y protocolo B en una variedad. Tomando en cuenta el número de embriones obtenido por protocolo de cultivo, excluyendo a la variedad control bajo el protocolo D se obtuvieron 51 embriones; bajo el protocolo A fueron 8 embriones y bajo los protocolos B y C se observaron para cada caso tres embriones. Estas cantidades nos dan cierta aproximación en cuanto al tipo de formulación adecuada aunque se debe considerar siempre al genotipo.

La calidad de los embriones es otro aspecto a considerar dentro de la regeneración de alfalfa por cultivo de tejidos. Una vez que se observa la formación de los embriones somáticos ya sea como estado globular o torpedo, se transfirieron individualmente a un medio de cultivo basal sin reguladores del crecimiento para permitir su conversión ó "germinación" en plantas completas. De acuerdo con dos Santos y colaboradores (1980) se observa que si los embriones somáticos permanecen adheridos al callo del que se originaron, no se desarrollarán en plantas completas. También observamos que aún individualizados en el medio de cultivo adecuado, muchos embriones declinan, su calidad no es óptima. Este aspecto de la calidad junto con la cantidad de embriones producidos son importantes porque determinan el éxito de la regeneración de al

falfa. De los embriones somáticos obtenidos procedentes de las variedades probadas prácticamente ninguno se desarrollo completamente en una planta normal. Aún en embriones de la línea A 70-34 se observaron malformaciones fenotípicas, sin embargo, hubo otros que si desarrollaron plantas normales. Consideramos un desarrollo normal de estas plantas en cultivo a aquellas que desarrollaron un buen sistema radicular, un epicotilo y hojas verdaderas. Como se mencionó en la introducción algunos autores entre ellos Stuart y coautores en 1985 reportan el empleo de aminoácidos en el medio de regeneración a fin de reforzar un buen patrón de conversión a plantas, encontrando que la L-glutamina mejora el rango de conversión a plantas. Meijer y Brown (1987b) puntualizan que la pobre calidad de los embriones que fueron inducidos con una alta concentración de 2-4-D fué igualmente observada para el clon embriogénico RA 3 . En este mismo material Stuart et al. (1985) encuentran una correlación positiva entre la calidad de los embriones y la cantidad de proteínas de reserva acumuladas por estos, proponiendo y así justificando el empleo de marcadores bioquímicos que en lo futuro puedan funcionar en el diagnóstico de la calidad de los embriones somáticos. Estos marcadores bioquímicos podrían ser las proteínas de reserva tal y como se expresan en los embriones cigóticos. Hasta la fecha no existe ninguna metodología que permita detectar material embriogénico en callos o bien calidad de los embriones observados, más que aspectos cualitativos a excepción de las proteínas de reserva como un adelanto. Por otra parte Nagarajan y Walton (1987) mencionan que muchas de estas anomalías fenotípicas se correlacionan con anomalías citológicas. Ellos en su trabajo observan cambios en el nivel de ploidía de las células de sus cultivos. Este hecho no resulta sorprendente si consideramos que se está manejando material con cuatro juegos cromosómicos y que al inducir la proliferación de callos las células tienen variaciones en su número de cromosomas . Esto puede ser la explicación de la baja calidad de los embriones obtenidos, sin embargo, no es claro el que altas concentraciones de 2,4-D favorezcan estos cambios. Ammirato (1987) opina que estas malformaciones están dadas por cambios epigenéticos durante la formación de los embriones, donde la división celular no está bien coordinada y se manifiesta una polaridad desigual del embrión. Este autor piensa que en estados tempranos de desarrollo del embrión es posible controlar estas anomalías con algunas manipulaciones en los medios de cultivo. La embriogénesis somática de alfalfa en variedades que se cultivan ampliamente en México es posible de lograr y se propone el seleccionar material embriogénico, optimizar sus condiciones de cultivo y de calidad para completar este sistema de regeneración.

## VII. CONCLUSIONES

Considerando los aspectos involucrados en la obtención de plantas de alfalfa por cultivo de tejidos y los resultados de este estudio con observaciones cualitativas y la de terminación de respuesta y rendimiento de nueve variedades de *Medicago sativa*, se enuncian las siguientes conclusiones:

- \* Las leguminosas han sido consideradas dentro de los sistemas de regeneración de plantas por cultivo de tejidos, difíciles de lograr, la alfalfa no se excluye de esta categoría.
- \* Se corrobora que la aplicación de esta metodología en alfalfa es genotipo-dependiente. Conocer de antemano el genotipo con que se trabaja constituye una garantía de que el germoplasma empleado se logre regenerar con facilidad o no. Las nueve variedades de alfalfa empleadas en este estudio poseen una fuerte carga genética de *M. sativa* cuya respuesta embriogénica fué del orden del 4% al 10%.
- \* Se observó la formación de callo en los cuatro tipos de inóculo, aunque en sus características como tamaño relativo, color y consistencia se observaron diferencias de variedad a variedad y entre plantas de una misma variedad.
- \* El sistema de regeneración de alfalfa depende en segunda instancia del protocolo de cultivo, esto es, tipo de medio de cultivo basal, cantidad y calidad de reguladores del crecimiento y las condiciones de incubación. Nuestros resultados con las variedades que se cultivan en México, indican que el mejor protocolo para monitoreo de capacidad de regeneración fué el protocolo D con un medio basal Bli2Y, seguido del protocolo A con un medio MS modificado.
- \* Dentro de las nueve variedades que se cultivan en México y empleadas para este trabajo, aquellas que mostraron respuesta embriogénica fueron: Velluda Peruana, Moapa 69, Sintético II Hidalgo, Valenciana y Sintético I Jardín. Las dos primeras mostraron mayor rendimiento que las tres últimas.
- \* Aquellas variedades que mostraron inducción positiva hacia la embriogénesis somática fueron: Puebla 76, INIA 76, Bajío 76, Sintético I Jardín, Sintético II Hidalgo, Velluda Perua



na y Valenciana. Esto nos indica que los protocolos de cultivo resultaron favorecedores hacia la inducción a embriogénesis y el punto crítico se centra en el medio de regeneración de embriogénesis somática.

- \* Para las variedades Moapa 69 y Velluda Peruana que en previos trabajos se había logrado regeneración a embriogénesis escasa o nula, en este trabajo sí se logró observar varios embriones somáticos en los cultivos.
  
- \* Para las variedades Sintético II Hidalgo, Valenciana y Sintético I Jardín, este es el primer trabajo en el que se prueba este material en cultivo y en el que se registra la observación de embriones somáticos de sus cultivos.
  
- \* El mejor rendimiento obtenido fué para Velluda Peruana gracias a un genotipo embriogénico que permitió verificar 12 embriones por callo en promedio para esta variedad, el resto de las variedades que formaron embriones fué de 1 a 2 embriones por callo en promedio.
  
- \* La calidad de los embriones somáticos obtenidos fué deficiente lo cual prácticamente imposibilitó la obtención de plantas regeneradas de alfalfa.
  
- \* Como algunas consideraciones a futuro sobre este trabajo se plantea seleccionar a aquel material que mostró respuesta embriogénica mayor, esto es, que en las variedades comerciales Moapa 69 y Velluda Peruana bajo los protocolos D y A, debe intensificarse el propósito de establecer el sistema de embriogénesis somática. Por una parte, es necesario aumentar el número de plantas a trabajar por variedad, a fin de elevar el número de aquellas que manifiesten el evento de embriogénesis somática; también es necesario modificar el medio de regeneración, verificar que los niveles de nitrógeno total no sean inferiores a 50mM y que este suplemento se dé tanto como sales inorgánicas reducida, lo cual hace disponible el nitrógeno a largo plazo a la planta, como bajo la forma orgánica (aminoácidos) que hacen disponible este elemento de manera inmediata a los cultivos. Para tratar de mejorar la calidad de los embriones somáticos, y retomando algunas ideas de la sincronización de la embriogénesis, se deberá hacer pruebas con aminoácidos como la L- glutamina para reforzar la calidad de los embriones, o bien para tratar de nivelar la mitosis en estados tempranos de desarrollo de los embriones somáticos se pueden someter

a tratamientos con bajas temperaturas (10°C a 15°C), durante un corto período de tiempo; o bien modificando la osmolaridad de los medios de cultivo probando diferentes niveles de sacarosa, o suplementar el medio de germinación con ácido abscísico (0.25µM a 1.5µM). Una vez establecido este sistema de regeneración por la vía de embriogénesis somática en alfalfa, se podrán realizar investigaciones a nivel bioquímico o molecular que nos permitan dilucidar los procesos fisiológicos de los cultivos que nos permitan proponer la solución a algunas de las limitaciones de este cultivo en México.

\* \* \*

## VIII, BIBLIOGRAFIA

**AGUIRRE J.** (1976)

Inia 76, Bajío 76, Puebla 76 y Mixteca 76, variedades mexicanas de alfalfa para la zona central de México. Folleto No. 62. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. SARH.

**AMMIRATO P. V.** (1984)

Embryogenesis. En: Handbook of Plant Cell Culture. Vol 2. Ammirato P.V., Evans D.A., Sharp W. R., Yamada Y. (eds) McMillan Publishing Co. New York. pp 82-123.

**AMMIRATO P.V.** (1987)

Organizational events during somatic embryogenesis. En: Plant Tissue and Cell Culture. Green C.E., Somers D.A., Hackett W.P., Biesboer D.D. (eds). Univ. of Minnesota, Alan R. Liss Inc, N.Y.

Anuario Estadístico de Producción Agrícola de los Estados Unidos Mexicanos (1985)

Superproducción y valor de las cosechas por entidad federativa. Dirección General de Economía Agrícola. SARH.

**ARCIONI S., M.R. DAVEY, A.V.P. dosSANTOS y E.C. COCKING.** (1982)

Somatic embryogenesis in tissues from mesophyll and cell suspension protoplasts of *Medicago coerulea* and *M. glutinosa*. A. Pflanzenphysiol. 106:105-110.

**ARTIGAS J.** (1984).

La Alfalfa, una planta de efectos dietéticos y terapéuticos sorprendentes. Ediciones Distribuciones S.A. Madrid, España.

**ATANASSOV A. y D.C.W. BROWN.** (1984)

Plant regeneration from suspension culture and mesophyll protoplasts of L. Plant Cell. Tiss. Org. Cult. 3: 149-162

**BINGHAM E.T., L.V. HURLEY, D.M. KAATZ y J.W. SAUNDERS.** (1975)

Breeding alfalfa wich regenerates from callus tissue in culture. Crop. Sci. 15: 719-721.

**BLAYDES D.F.** (1966).

Interaction of kinetin and various inhibitors in the growth of soybean tissue. Physiol. Plant. 19:748-753.

**BOLTON J.L., B.P. GOPLEN y H. BAEZINGER.** (1972)

World distribution and historical developments. En: Alfalfa Science and Technology. No 15 series Agronomy. Hanson C.H. (ed). American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin.

**BRAUER H.B.** (1986).

Fitogenética aplicada. Ed. Limusa, México, D.F.

- BROWN D.C.W. y A. ATANASSOV. (1985)**  
Role of genetic background in somatic embryogenesis in *Medicago*.  
Plant Cell. Tiss. Org. Cult. 4:111-122.
- BULLER R.E. (1958).**  
Resultados y orientación de las investigaciones sobre forrajes en la Mesa Central y el Trópico. Primer Simposio de Investigación Agrícola en México. Escuela Nacional de Agricultura. SAG. México.
- BULLER R.E. y G.R. VALDIVIESO. (1957)**  
La producción de alfalfa, variedades, siembra y utilización forrajera. Secretaría de Agricultura y Ganadería. México, D.F.
- BULLER R. E., G.R. VALDIVIESO y T.R. GARZA. (1958)**  
Comportamiento de variedades seleccionadas de alfalfa y recomendaciones para su mejoramiento en México. Oficina de Estudios Especiales. SAG. México, D.F.
- CASTRO A.L. (1978)**  
Alfalfa. En: Análisis de los recursos genéticos disponibles a México. Cervantes S.T. (ed). SOMEFI, A.C. Chapingo, México. pp 165-170.
- CASTRO A.L. (1982)**  
Guía para cultivar alfalfa en los estados de México e Hidalgo. Folleto para productores No. 15. INIA-SARH. México.
- CLAVERAN A.R. (1978)**  
Leguminosas forrajeras. En: Análisis de los recursos genéticos disponibles a México. Cervantes S.T. (ed). SOMEFI A.C. Chapingo. pp 171-178.
- CONGER B.V. (1980)**  
Agronomic Crops. En: Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques. Conger B.V. (ed). C.R.C. Press. Florida. pp 165-215.
- DEL POZO I.M (1977)**  
La alfalfa su cultivo y aprovechamiento. Segunda edición. Ed. Mundi Prensa. España.
- DIJAK M. y D.C.W. BROWN (1987a)**  
Donor tissue and culture condition effects on mesophyll protoplasts of *Medicago sativa*.  
Plant Cell. Tiss. Org. Cult. 9(3): 217-228.
- DIJAK M. y D.C.W. BROWN (1987b)**  
Patterns of direct and indirect embryogenesis from mesophyll protoplasts of *Medicago sativa*.  
Plant Cell Tiss. Org. Cult. 9(2): 121-130.
- DODDS J.H. y L.W. ROBERTS (1982)**  
Experiments in Plant Tissue Culture  
Cambridge University Press. New York.

- DONAHUE R.L., E.F. EVANS y L.I. JONES.** (1962)  
La explotación racional de pastos y praderas artificiales.  
CECSA, México, D.F.
- dos SANTOS A.V.P., E.G. CUTTER y M.R. DAVEY.** (1983)  
Origin and development of somatic embryos in *Medicago sativa* L.  
(Alfalfa). *Protoplasma* 1117:107-115.
- dos SANTOS A.V.P., D.E. OUTKA, E.C. COCKING y M.R. DAVEY.** (1980)  
Organogenesis and somatic embryogenesis in tissues derived from  
leaf protoplasts and leaf explants of *Medicago sativa*.  
*Z. Pflanzenphysiol.* 99:261-270.
- EVANS D.A., W.R. SHARP y C.E. FLICK.** (1981)  
Growth and behavior of cell cultures, embryogenesis and organoge-  
nesis. En: *Plant Tissue Culture Methods and Applications in  
Agriculture*. Thorpe T.A. (ed). Proceedings of UNESCO Symposium,  
Sao Paulo Brazil. Academic Press, New York. pp 45-113.
- GAMBORG U.L., R.A. MILLER y K. OJIMA.** (1968)  
Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells.  
*Exp. Cell Res.* 50: 151-158.
- HALPERIN W.** (1966)  
Alternative morphogenetic effects in cell suspension cultures.  
*Amer. J. Bot.* 53: 443-453.
- HANSON C.H.** (ed), (1972)  
Alfalfa Science and Technology. No 15 series Agronomy.  
American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin.
- HANSON C.H., H.M. TYSDAL y R.L. DAVIS.** (1978)  
Alfalfa. En: *Forrajes*. Hughes H.D., Heath M.E. y Metcalfe D.S. (eds).  
CECSA, México, D.F. pp 151-172-
- HARTMAN H.T. y D.E. KESTER.** (1980)  
Propagación de plantas, principios y prácticas.  
CECSA, México, D.F.
- HAVARD-DUCLOS B.** (1969)  
Las plantas forrajeras tropicales.  
Ed. Blume, Barcelona, España.
- JOHNSON L.B., D.L. STUTEVILLE, R.R. HIGGINS y D.Z. SKINNER.** (1981)  
Regeneration of alfalfa plants from protoplasts of selected Regen S  
clones. *Plant Sci. Lett.* 20: 297-304.
- JUSCAFRESA B.** (1974)  
Forrajes, fertilizantes y valor nutritivo.  
Segunda edición. Ed. Aedos, Barcelona, España.

- KAO K.N. y M.R. MICHAYLUK** (1980)  
Plant regeneration from mesophyll protoplasts of Alfalfa.  
*Z. Pflanzenphysiol.* 96: 135-141.
- KAO K.N. y M.R. MICHAYLUK**. (1981)  
Embryoid formation in alfalfa cell suspension cultures from different plants. *In vitro* 17(7): 645-648.
- LAWRENCE G.H.M.** (1951)  
Taxonomy of Vascular Plants.  
McMillan Publishing Co. Inc. New York.
- LESINS K.** (1984)  
Alfalfa, lucerne. En: Evolution of crop plants. Simmonds N.W (ed).  
Longman, England, U.K. pp 165-168.
- LINSMAIER F.M. y F. SKOOG.** (1965)  
Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures.  
*Physiol. Plant.* 18: 100-127.
- LU D.Y., M.R. DAVEY y E.C. COCKING.** (1983)  
A comparison of the cultural behavior of protoplasts from leaves, cotyledon and roots in *Medicago sativa*.  
*Plant. Sci. Lett.* 31: 87-99.
- LUPPOTTO E.** (1983)  
Propagation of an embryogenic culture of *Medicago sativa* L.  
*Z. Pflanzenphysiol.* 111: 95-104.
- MAGALLANES G.J.V.** (1986)  
De entre las Forrajeras, la Alfalfa una opción.  
En: Mundo Agropecuario 2(1). Ed. Colibrí, México.
- McCOY T.J. y E.T. BINGHAM.** (1977)  
Regeneration of diploid alfalfa plants from cells grown in suspension culture. *Plant Sci. Lett.* 10: 50-66.
- McCOY T.J. y K. WALKER.** (1984)  
Alfalfa. En: Handbook of Plant Cell Culture. Vol 3.  
Ammirato P.V., EVANS D.A., Sharp W.R., Yamada Y. (eds).  
McMillan Publishing Co., New York. pp 171-192.
- MEIJER E.G.M. y D.C.W. BROWN.** (1985)  
Screening of diploid *Medicago sativa* for somatic embryogenesis.  
*Plant Cell Rep.* 4:285-289.
- MEIJER E.G.M. y D.C. W. BROWN.** (1987a)  
Role of exogenous reduced nitrogen and sucrose in rapid high frequency somatic embryogenesis in *Medicago sativa*.  
*Plant Cell. Tiss. & Org. Cult.* 10: 11-19

- MEIJER E.G.M. y D.C.W. BROWN. (1987b)**  
A novel system for rapid high frequency somatic embryogenesis in *Medicago sativa* *Physiol. Plant.* 69: 591-596.
- MELA M.P. (1963)**  
Cultivos de regadíos. Tomo 1.  
Ed. Agrociencia. Zaragoza, España.
- MESENTSEV A.V. y N.A. KARELINA. (1982)**  
Effects of genotypic variations on callus formation and somatic embryogenesis in tissue culture of alfalfa in normal and extreme environmental. *Genetika* 18(6): 999-1003.
- MITTEN D.H., S.J. SATO y T.A. SKOKUT. (1984)**  
*In vitro* regenerative potential of alfalfa germplasm sources. *Crop Sci.* 24: 943-945.
- MURASHIGE T y F. SKOOG. (1962)**  
A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-462.
- NAGARAJAN P., J.S. MCKENZIE y P.D. WALTON. (1986)**  
Embryogenesis and plant regeneration of *Medicago* spp. in tissue culture. *Plant Cell. Rep.* 5: 77-80.
- NAGARAJAN P. y P.D. WALTON. (1987)**  
A comparison of somatic chromosomal instability in tissue culture regenerants from *Medicago media* Pers. *Plant Cell Rep.* 6: 109-113.
- NOVAK F.J. y D. KONECNA. (1982)**  
Somatic embryogenesis in callus and cell suspension cultures of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Z. Pflanzenphysiol.* 105: 279-284.
- PEZOTTI M., S. ARCONI y D. MARIOTTI. (1984)**  
Plant regeneration from mesophyll, root and cell suspension protoplasts of *Medicago sativa* cv. Adriana. *Genet. Agr.* 38: 195-208.
- PHILLIPS G.C. (1983)**  
Screening alfalfas adapted to the southwestern United States for regenerator genotypes. *In vitro* 19(3): 265.
- RADFORD A.E., W.C. DICKINSON, J. MASSEY y R.C. BELL. (1974)**  
*Vascular Plants Systematics.*  
Harper & Row Publishers INC. U.S.A. pp 651-669.
- REISCH B. y E.T. BINGHAM. (1980)**  
The genetic control of bud formation from callus cultures of diploid alfalfa. *Plant Sci. Lett.* 20: 71-77.

- ROBLES S. R.** (1979)  
Producción de granos y forrajes.  
Segunda edición. Ed. Limusa, México. D.F.
- SAUNDERS J.W. y E.T. BINGHAM** (1972)  
Production of alfalfa plants from callus tissue.  
Crop. Sci. 12: 804-808.
- SAUNDERS J.W. y E.T. BINGHAM.** (1975)  
Growth regulator effects on bud initiation in callus cultures of *Medicago sativa*.  
Amer. J. Bot. 62(8): 850-855.
- SCHENK B.U. y A.C. HILDEBRANDT.** (1972)  
Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures.  
Can. J. Bot. 50: 199-204.
- SHARP W.R., M.R. SONDHAL, L.S.CALDAS, y S.B. MARAFFA.** (1980).  
The physiology of asexual embryogenesis.  
Hort. Rev. 2:268-310.
- SKOKUT T.A., J. MANCHESTER y J. SCHAEFER.** (1985)  
Regeneration in alfalfa tissue culture stimulation of somatic embryo production by amino acids and N-15 NMR determination of nitrogen utilization. Plant. Physiol. 79: 579-583.
- STAVAREK S.J., T.P. CROUGHAN y D.W. RAINS.** (1980).  
Regeneration of plants from long-term cultures of alfalfa cells.  
Plant. Sci. Lett. 19: 253-261.
- STUART D.A., J. NELSEN y J.W. NICHOL.** (1985)  
Factors affecting developmental processes in alfalfa cell cultures.  
En: Tissue Culture in Forestry and Agriculture. Henke K.W., Constantin M.P. y HOLLAENDER A. (eds). Plenum Publishing Co. New York. pp 59-73.
- STUART D.A. y S.G. STRICKLAND** (1984a)  
Somatic embryogenesis from cell cultures of *Medicago sativa* L. I  
The role of amino acids additions to the regeneration medium.  
Plant Sci. Lett. 34:165-174.
- STUART D.A. y S.G. STRICKLAND** (1984b)  
Somatic embryogenesis from cell cultures of *Medicago sativa* L. II  
The interaction of amino acids with ammonium.  
Plant Sci. Lett 34: 175-181.
- TISSERAT B., E.B. ESAU y T. MURASHIGE.** (1979)  
Somatic embryogenesis in angiosperms.  
Horticultural Rev. 1: 1-78



Variedades autorizadas de los principales cultivos con las indicaciones para las épocas de siembra y cosecha. Ciclo agrícola 1984-1985. Cultivo de alfalfa. Dirección General de Agricultura. SARH, México.

**VILLALOBOS A.V.M.** (1985)

Las bases morfogénicas en la propagación de especies perennes. En: El Cultivo de Tejidos Vegetales en México. Robert M.L. y Loyola V.M. (compiladores). Centro de Investigación Científica de Yucatán y CONACyT. México, D.F. pp 55-61.

**WALKER K.A. y S.J. SATO.** (1981)

Morphogenesis in callus tissue of *Medicago sativa* : the role of ammonium ion somatic embryogenesis. Plant Cell Tiss. & Org. Cult. 1: 109-121.

**WALKER K.A., M.L. WENDELN y E.G. JAWORSKI.** (1979)

Organogenesis in callus tissue of *Medicago sativa* . The temporal separation of induction processes from differentiation processes. Plant Sci. Lett. 16: 23-30.

**WALKER K.A., P.C. YU, S.J. SATO y E.G. JAWORSKI.** (1978)

The hormonal control of organ formation in callus of *Medicago sativa* L. cultured *in vitro*. Amer. J. Bot. 65(6): 654-659.

**WEAVER R.J.** (1980)

Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. Ed. Trillas, México, D.F. pp 91-131.

**WILLIAMS E.G. y G. MAHESWARAN.** (1986)

Somatic Embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. Ann. Bot. 57: 443-462.

**XU Z.H., M.R. DAVEY y E.C. COCKING.** (1982)

Organogenesis from root protoplasts of the forage legumes *Medicago sativa* and *Trigonella foenum-graecum*. Z. Pflanzenphysiol 107: 231-235.

\* \* \*

## APENDICE A

### CARACTERISTICAS AGRONOMICAS SOBRESALIENTES DE CADA VARIEDAD DE ALFALFA.

#### PUEBLA 76 (Aguirre, 1976; Castro, 1982)

Esta variedad fué seleccionada por sus altos rendimientos en El Bajío y en los estados de México y Puebla. Se adapta bien en Guanajuato, México, Puebla y Aguascalientes.

La variedad "Puebla 76" se formó del ecotipo de alfalfa denominado "Atlixco", el cual por selección natural, a través de varias décadas se adaptó a la zona alfalfera del estado de Puebla, Originalmente este ecotipo fué colectado en la región de Atlixco en el mismo estado y fué sometido a ensayos comparativos de rendimiento de variedades comerciales en diferentes localidades.

Es una variedad con rendimientos superiores a los de las variedades comerciales utilizadas en las zonas alfalferas de El Bajío, Aguascalientes, Chapingo y Tecamachalco. En el área de El Bajío durante la época invernal sus rendimientos son superiores al material importado; su precocidad permite darle de 9 a 10 cortes al año y con un crecimiento de los tallos hasta 57 cm de altura. El grado de susceptibilidad de esta variedad al ataque de enfermedades foliares y de la raíz se considera que es similar al del material introducido.

#### I N I A 76 (Aguirre, 1976; Castro, 1982)

Esta variedad se seleccionó por sus altos rendimientos y por su amplia adaptabilidad en las zonas alfalferas del centro del país. desarrollándose bien en los estados de Guanajuato, Michoacán, México, Puebla y Aguascalientes.

INIA 76 se formó del ecotipo de alfalfa denominado "Tanhuate", el cual por selección natural y a través de varias décadas se adaptó a la zona alfalfera de Tánhuato, Michoacán. Originalmente este ecotipo fué colectado en esta misma región y estuvo sometido a ensayos comparativos de rendimiento con variedades comerciales en diferentes localidades.

Es una variedad con rendimientos superiores a las variedades tradicionalmente utilizadas en el centro del país. Durante la época invernal, en regiones como El Bajío, ha superado a las variedades importadas; su precocidad permite darle de 9 a 10 cortes anuales; de crecimiento erecto alcanzando una altura hasta de 55 centímetros; con abundante follaje y su grado de resistencia al ataque de *Peronospora trifoliorum* o mildiú vellosa es superior al de la variedad Moapa.

BAJIO 76 (Aguirre, 1976; Castro, 1982)

Esta variedad se formó a partir del ecotipo denominado "San Miguelito", el cual por selección natural y después de varias décadas se adaptó a la zona alfalfera de El Bajío. Originalmente este ecotipo fué colectado en la región de San Miguel Octapan, Guanajuato y fué sometido a ensayos comparativos de rendimiento con respecto a variedades comerciales en diferentes localidades del país.

Es una variedad con rendimientos superiores a las variedades comerciales utilizadas en El Bajío y en el estado de Puebla. Durante la época invernal, en regiones como El Bajío, ha superado a las variedades importadas; su precocidad permite darle de 9 a 10 cortes al año; de porte erecto con una altura hasta de 50 cm y de abundante follaje. Se ha observado que el grado de susceptibilidad al ataque de enfermedades foliares y de la raíz es similar al del material importado.

#### SINTETICO I JARDIN Y SINTETICO II HIDALGO

Este material está siendo evaluado aún por investigadores del INIFAP-SARH, por lo que solo se mencionarán los datos concernientes al origen de cada variedad. Esta valiosa información fué proporcionada en comunicación personal por el Ing. Luis Castro Acero investigador de dicho centro.

##### Sintético I Jardín.

Está formado por 6 clones cuyo origen es: dos clones de la variedad N-510 y un clon de cada una de las variedades Kansas, EXEL 320, Valenciana (Aragón) y Sn Joaquín II.

##### Sintético II Hidalgo.

Este material está formado por 7 clones, cuyo origen principalmente es a partir de la variedad Valenciana ampliamente cultivada en el estado de Hidalgo.

#### MOAPA 69 (Hanson, 1972; Del Pozo, 1977)

Esta variedad fué formada en 1969 por la compañía Nevada AES & ARS a partir de la variedad "Africana", la cual fué introducida de Egipto a los Estado Unidos en 1924.

Población de *N. sativa* pura, de floración temprana. No es resistente al frío. Es de crecimiento erecto y buena recuperación después del corte. Sobresale su resistencia a el ataque del áfido *Terioaphis maculata*. Se suelen obtener muy buenos rendimientos con esta variedad, sobretodo durante los dos primeros años.

SAN JOAQUIN II (Castro Acero, comunicación personal).

Esta variedad fué sintetizada en San Joaquín, California por la compañía Security Seed Company mediante la selección de 7 clones cuyo origen proviene de las variedades "Afganistán" y "Africana".

De acuerdo a sus características, es muy parecida a Moapa. Sobresale su resistencia al pulgón manchado y a la pudrición de la corona y de la raíz, ocasionadas por plagas y enfermedades. Su rendimiento es similar al de la variedad Moapa y prácticamente no presenta dormancia.

VELLUDA PERUANA (Del Pozo, 1977)

Ecotipo peruano introducido a Estados Unidos en 1899, desde donde se ha dispersado ampliamente su cultivo. Su característica principal es que sus hojas y tallos suelen ser velludos o pilosos. Es una población pura de *M. sativa* de precocidad temprana, rápido desarrollo, buena recuperación después de cada corte, habilidad de crecimiento en días de corto fotoperíodo, aunque se la considera de menor rendimiento y menor calidad que la variedad Moapa.

VALENCIANA (Del Pozo, 1977)

Su origen se centra en el Valle medio del Ebro, al sur de Navarra, España por lo que en ocasiones se le encuentra igualmente nominada como "Aragón". Tolera climas de verano cálido y ciertas condiciones de riego prolongado. En invierno tolera temperaturas hasta de menos de 15°C. Su rendimiento permite de 5 a 7 cortes al año, sin embargo, a los 4 o 5 años su producción declina considerablemente. La calidad de su forraje es buena. Se ha observado que menos del 7% de sus flores son variegadas.

A 70-34 (Villegas Garrido, comunicación personal)

Esta variedad ha sido seleccionada de la variedad canadiense Rangelander, población de *M. media* con fuerte aportación de *M. falcata*. Algunas de sus características son: flores de color morado; presenta en ocasiones brotes en puntos hinchados de la raíz fenómeno también conocido como hábito radicular rastrero; resistencia a heladas y dormancia durante la época invernal.

\* \* \*