



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"IZTACALA"**

**INDUCCION DE EMBRIOGENESIS SOMATICA EN
PAPA (Solanum tuberosum L.)**



T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

MARIA ISABEL SAAD VILLEGAS



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

	PAGINA
INTRODUCCION	1
REVISION BIBLIOGRAFICA	9
ANTECEDENTES DE EMBRIOGENESIS EN PAPA	22
OBJETIVOS	25
CONCLUSIONES DE LA REVISION BIBLIOGRAFICA	26
METODOLOGIA	28
RESULTADOS Y DISCUSION	41
CONCLUSIONES	74
CONSIDERACIONES FINALES	76
BIBLIOGRAFIA	78
APENDICE 1: MEDIOS UTILIZADOS	85
APENDICE 2: MEDICION DE CRECIMIENTO CELULAR EN CULTIVOS VEGETALES EN SUSPENSION	87.

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

Ante el reto que representa el aumento sostenido de la población mundial, tenemos que responder con mayor producción de alimentos. A pesar de que contamos con cultivares de muy alto rendimiento, la producción agrícola está fuertemente limitada por factores que se agravan día con día. Los principales obstáculos a salvar son la carencia de tierras cultivables, el estrés ambiental y las enfermedades o plagas.

En México, sólo un 15% del territorio nacional tiene suelos adecuados para la agricultura (43). La disponibilidad de agua es un problema general (y amenaza con convertirse en el principal problema de la siguiente década). El régimen de cultivo de temporal sigue siendo preponderante, por eso el volumen de las cosechas es muy susceptible a pérdidas ocasionadas por la sequía o el atraso de las lluvias (43).

La lucha contra el hambre se ha librado empleando una forma de agricultura altamente tecnificada que ha causado más problemas de los que ha resuelto. Los altos rendimientos se han pagado con agrosistemas fuertemente dependientes de los insumos, con suelos salinizados por el riego y contaminados con fertilizantes y plaguicidas, y con cuerpos de agua continentales eutróficos. El cultivo prolongado de variedades muy productivas ha influido en la desaparición de especies y ha roto el equilibrio de los ecosistemas, lo que explica la proliferación de plagas en forma de malezas, enfermedades y parásitos.

Este panorama hace prioritarias las investigaciones sobre especies de importancia alimenticia, tendientes a conservar la diversidad y a obtener variedades resistentes a las plagas y al estrés ambiental.

Una especie de interés

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es una de las especies más importantes para la alimentación humana, porque presenta dos características notables: excelente valor nutricional y alto rendimiento por hectárea. Esta planta de fácil digestibilidad y delicioso sabor, tiene proteínas de muy alta calidad - por su contenido de aminoácidos esenciales- y alto porcentaje de carbohidratos. Desde el punto de vista agrícola, produce mayor cantidad de alimento por unidad de superficie que cualquier otro cultivo (28 , 35).

Todo esto ha hecho de la papa una de las especies más cultivadas en el mundo. En el siglo V a.c. ya era consumida por los incas y los habitantes de Mesoamérica, fue llevada a Europa en el siglo XVI por los españoles y de ahí se distribuyó a todos los continentes. En los siglos siguientes se convirtió en un cultivo popular y hoy es considerada como alimento básico en muchos países desarrollados como Inglaterra, Holanda, Alemania y Suecia (28).

Biodiversidad

Cuando los hombres empezamos a practicar la agricultura las plantas que cultivábamos eran doblemente seleccionadas, eran elegidas por la naturaleza y por el hombre. Este proceso duplicado aumentaba la

diversidad de las especies. Durante muchos años la variabilidad se mantuvo porque había flujo genético constante entre poblaciones cultivadas y poblaciones silvestres. Durante los últimos cientos de años la situación cambio. La selección artificial transformó los cultivos primitivos en cultivares altamente productivos.

Buscando poblaciones uniformes en la presencia de características muy bien definidas, se hicieron cruza y se obtuvieron híbridos con una base genética cada vez más pobre. Las prácticas culturales también cambiaron. Ante la presencia de nuevos recursos técnicos se seleccionó prestando cada vez menos atención a los factores ambientales, entonces muchas razas adaptadas a condiciones específicas desaparecieron y fueron reemplazadas por unos cuantos cultivares altamente productivos.

Prácticas como estas son sumamente dañinas a la larga, porque una población muy homogénea no tiene capacidad de respuesta a las presiones del ambiente. La historia de la papa es un ejemplo muy dramático de lo inconveniente que resulta mantener un número limitado de genotipos. Los mejoradores de papa en Europa y Estados Unidos de América trabajaron con unos cuantos genotipos introducidos en Europa en los siglos XVI y XVII, la base genética de este material era muy pobre desde el inicio. Cuando llegaron a estas latitudes organismos que atacan a la papa, ocasionaron epidemias desastrosas que arrasaron con todos los cultivos y causaron pérdidas de billones de dolares. En 1885, en Irlanda murieron 250 000 personas por las hambrunas derivadas de dichas pérdidas (35).

Los agricultores comprendieron entonces la importancia de la

diversidad. Se pensó en los centros de origen y los mejoradores recibieron materiales provenientes de Sudamérica y México. Mediante cruza controladas pronto obtuvieron variedades muy eficientes que tenían además muy alta diversidad genética. Estas variedades fueron introducidas en todo el planeta y causaron graves pérdidas de cultivares primitivos que se encontraban en desventaja ante ellas. Los botánicos y mejoradores dieron la voz de alarma, era imprescindible conservar la variabilidad genética (35).

La solución a este problema fue el establecimiento de sistemas para conservar la biodiversidad. El Centro Internacional de la Papa tiene por objeto conservar la diversidad de esta especie, en él, las distintas variedades de papa son evaluadas y conservadas en bancos de germoplasma donde permanecen disponibles para los agricultores de todo el mundo.

Conservar adecuadamente los recursos genéticos de la papa se convirtió en el problema inmediato a resolver en estos bancos de germoplasma. La propagación por semilla fue descartada porque el hacer pasar a las plantas por el ciclo sexual puede resultar en segregación de caracteres deseables y destruir así una combinación específica de características que hacen importante a una variedad. En consecuencia, se optó por la forma de propagación vegetativa tradicional en esta especie, la propagación por tubérculos (4, 20, 46).

El cultivo en el campo presentaba varios inconvenientes, el primero de los cuales, era la necesidad de grandes extensiones de suelos; otro, era el riesgo de exponer a las plantas a los factores

estresantes del ambiente, tanto abióticos como bióticos y otro más, era la posibilidad de que los cultivos sufrieran el ataque de patógenos y parásitos durante el ciclo vegetativo. En relación con este último inconveniente surgía un problema adicional: la distribución e intercambio de material genético se veían restringidos por leyes fitosanitarias, ya que para transportar era necesario tener la certeza de que el material estaba completamente sano. La solución a todos estos problemas se encontró en una ciencia práctica que se inició en las primeras décadas de este siglo y que tuvo un desarrollo muy acelerado: el cultivo de tejidos vegetales (46).

Biotecnología vegetal

El cultivo de tejidos vegetales es una disciplina dedicada a la reproducción de un tejido, célula u órgano vegetal bajo condiciones artificiales y asépticas. Si se cultiva una pequeña porción de planta en el medio nutritivo adecuado y bajo condiciones físicas convenientes, puede lograrse el desarrollo de una planta completa, haciendo así posible la obtención de una gran cantidad de plantas a partir de una sola. Esta capacidad de incremento masivo ha abierto una amplia gama de posibilidades en el estudio y propagación de las plantas (27).

El cultivo in vitro de células vegetales da a las plantas muchas ventajas antes restringidas a los microorganismos: la disponibilidad de material celular homogéneo de diversas poblaciones, con tiempos de generación cortos, en sistemas de cultivo reproducibles que ocupan poco espacio. Por ello, las plantas se han convertido en excelentes

modelos para investigación básica, y en el área aplicada, esta forma de cultivo se ha revelado como una poderosa herramienta.

El potencial de esta novedosa técnica se ha mostrado muy ampliamente en la conservación de la biodiversidad. Los bancos de germoplasma se volvieron funcionales sólo cuando adoptaron como forma de propagación el cultivo aséptico. Así lograron: minimizar pérdidas causadas en el campo por patógenos, cambios climáticos y desastres naturales; disminuir requerimientos de espacio a pequeñas áreas; propagar un amplio rango de genotipos; cultivar en condiciones óptimas controladas; transferir adecuadamente plantas del cultivo in vitro al suelo y transportar material valioso a otros programas o ciudades, sin riesgo de diseminar enfermedades (4, 20, 46).

Sin embargo, estamos todavía muy lejos de tener todo resuelto. Mantener cientos de genotipos en condiciones que garanticen su viabilidad y estabilidad, no resulta sencillo.

En un medio de crecimiento normal, las plantas cultivadas in vitro tienen que ser constantemente transferidas a medio fresco, esto implica un alto costo de mantenimiento, pues la conservación con esta técnica requiere gran cantidad de reactivos y muchas horas de mano de obra. Por eso se han estudiado e implementado distintas formas de reducir la tasa de crecimiento. Se ha experimentado: agregando al medio de cultivo sustancias inhibitorias, reduciendo la energía radiante, incubando en bajas temperaturas y aplicando estrés osmótico.

En la papa se obtienen buenos resultados bajando la temperatura y con estrés osmótico. Pero para extender el tiempo de transferencia de

2 a 18 ó 24 meses, se emplean estrategias combinadas de estrés osmótico, bajas temperaturas, iluminación pobre y fotoperiodos muy largos. Sólo así se han podido mantener colecciones de 1400 cultivares y de todos modos los costos de operación son muy altos (20).

Quizá el principal inconveniente del cultivo aséptico se encuentra en la estabilidad de los genotipos, ya que esta forma de propagación vegetativa produce variación genética -durante el cultivo ocurren rearrreglos cromosómicos-. En efecto, se ha comprobado que existe relación directa entre el tiempo que el material vegetal creció como callo y la probabilidad de encontrar cambios cromosómicos (20). Además, este sistema de cultivo sufre presiones de selección muy distintas de las que actúan sobre las plantas desarrolladas en el suelo. Las presiones de selección son todavía más divergentes en las condiciones de cultivo que impone la necesidad de crecimiento lento. Como esto puede estar causando cambios indeseables en las variedades cultivadas, se está trabajando intensamente en la búsqueda de alternativas (20).

En este entendido se usan brotes axilares, para no pasar por la fase de callo y reducir así la probabilidad de variación genética. De cualquier manera hay cambios morfológicos detectables como: pérdida de vigor, disminución en la talla de las hojas y etiolación; resultado de la acción prolongada de los factores estresantes del medio de cultivo y el ambiente sobre las células vegetales.

La forma natural de conservación de la papa durante la estación desfavorable es la formación de tubérculos, por eso se pensó en la

inducción de tubérculos in vitro como una alternativa viables. Aunque resultó sencillo obtener tubérculos en cultivo aséptico (35), éstos no resultaron propágulos adecuados, su relación superficie-volumen es muy grande, lo que impide prolongados períodos de almacenamiento, pues se secan rápidamente y pierden en corto tiempo su capacidad morfogénica (4).

La mejor opción con que contamos para conservar germoplasma durante largos períodos de tiempo es la criopreservación almacenamiento en temperaturas muy bajas, (-196 °C), pero este método no es aplicable todavía para colecciones grandes de material vegetal.

La alternativa que buscamos para el mantenimiento de germoplasma de papa, tiene que ser una forma de propagación vegetativa, para evitar el riesgo de cambios genotípicos; es necesario también que sea una forma de propagación in vitro, para contar con las ventajas del cultivo controlado y se requiere una forma de propagación que soporte largos períodos de tiempo de almacenamiento en seco. Lo que necesitamos entonces, es una semilla asexual obtenida en condiciones asépticas y controladas. Estas expectativas son cubiertas ampliamente por una de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales: la formación de embriones somáticos (1, 11, 33, 38, 40).

En este trabajo dimos los primeros pasos en este sentido, estableciendo la metodología para la obtención de embriones somáticos de papa en las primeras fases de desarrollo.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

EMBRIÓGENESIS SOMÁTICA

Se conoce como embriogénesis somática al proceso mediante el cual, células somáticas en cultivo forman embriones adventicios que presentan los mismos estados de desarrollo característicos de los embriones cigóticos.

La eventual germinación de los embriones obtenidos mediante este proceso lleva a la formación de una planta completa.

Steward en 1958 y Reinert en 1959, observaron que células de zanahoria crecidas en un cultivo de callos en suspensión, tenían habilidad de formar unidades estructurales discretas con una forma de desarrollo similar a la que presentan los embriones cigóticos. Si estos embriones se ponían en las condiciones adecuadas, germinaban y producían plantas completas. Ellos llamaron a estos propágulos embriones somáticos (11).

Se reconoció de inmediato la importancia potencial de la embriogénesis somática como forma de multiplicación clonal. Este descubrimiento fue el inicio de una serie de investigaciones tendientes a probar el método en otros grupos de plantas y a definir el proceso en términos bioquímicos. En los años siguientes se consiguió inducir embriogénesis somática por métodos empíricos -en sistemas sólidos y más ampliamente en sistemas líquidos- en una larga lista de plantas. Hoy sabemos que el fenómeno es común y ocurre probablemente en todas las familias de plantas, porque en todos los

vegetales permanecen en la vida adulta células indiferenciadas (3, 40).

Las células indiferenciadas son totipotenciales, es decir, tienen toda la información que se requiere para producir un organismo multicelular completo y pueden expresar esta información. La realización de la totipotencialidad por embriogénesis somática, requiere de estas células libres de restricciones físicas y químicas impuestas por la planta madre (3). Para transitar del estado quiescente al estado regenerativo, necesitan estímulos adecuados. Se han reconocido los pasos involucrados en la inducción, desarrollo y maduración de embriones a partir de células somáticas, pero nuestro conocimiento de la regulación de la embriogénesis somática es incompleto y es mucho todavía lo que tenemos que definir sobre este proceso (3, 17, 38, 41, 50).

La inducción de embriogénesis somática es un proceso complejo dirigido por mecanismos múltiples, ya que está regulado por estímulos hormonales y factores no hormonales, tales como: azúcares, compuestos nitrogenados reducidos y osmóticos agregados al medio nutritivo; efectos físicos como luz, temperatura, humedad relativa y consistencia del medio; el tipo de tejidos empleados y sus características; tasa de crecimiento de las células; e incluso, interacciones específicas célula-célula para la formación de microambientes adecuados (11, 22, 38, 40).

Hay dos formas de producción de embriones somáticos: embriogénesis directa y embriogénesis indirecta. La embriogénesis

directa consiste en la formación de embriones asexuales derivados de células individuales o grupos de células de alguna parte del tejido usado como explante, sin que antes participe una etapa de callo (10). Esta forma de inducción es la menos empleada.

La embriogénesis indirecta involucra el establecimiento en cultivo de un explante, subsecuente proliferación de callo e iniciación de proembriones; transferencia de callo a un medio nutritivo adecuado para el desarrollo de embriones bipolares a partir de los proembriones iniciales y cambio de los embriones a un medio de maduración (11).

En aras de hacer más sencilla la explicación del proceso lo dividiremos en dos etapas: embriogénesis temprana y embriogénesis avanzada.

Embriogénesis Temprana.- La embriogénesis temprana ocurre en dos pasos: el primero, es la inducción y el segundo, es el desarrollo o expresión de la embriogénesis. Los requerimientos de la inducción y el desarrollo de embriones difieren y por lo tanto, a menudo se usan medios separados para cada paso. Nos referiremos primero a la inducción.

Para la inducción de embriones somáticos se emplea un medio nutritivo con una fórmula de sales que contenga altos niveles de nitrógeno en forma de nitrato de amonio. En la mayoría de los casos (70%) los explantes se cultivan en medio Murashige-Skoog 1962 (MS) o en una modificación de él (1,41).

Los eventos ontogénicos y fisiológicos que ocurren durante la

inducción son muy complicados. Mediante un estímulo hormonal adecuado se promueve crecimiento celular desorganizado, formándose callo y estructuras embriogénicas iniciales. Las auxinas parecen ser un factor limitante, se emplea generalmente 2,4-D solo o en combinación con una citocinina como cinetina (1,22,40). Una vez que se establece este patrón de crecimiento sigue un período de intensa proliferación celular que va de 3 a 8 semanas.

La iniciación de crecimiento es mucho más rápida en medio semisólido. Cuando se tiene la suficiente masa celular, el callo se extrae, se fracciona y se transfiere a un medio líquido con la misma composición usada en el medio iniciador. Se cambia a cultivo en suspensión porque éste ofrece algunas ventajas sobre el cultivo estacionario. Las células crecidas en un medio líquido están siempre expuestas a las mismas concentraciones de nutrientes y reguladores de crecimiento, esto permite una mejor manipulación del medio de cultivo y con ello un mayor control del crecimiento y desarrollo celulares (41).

Para establecer un cultivo en suspensión de células vegetales suelen emplearse matraces Erlenmeyer convencionales colocados en agitadores orbitales de flujo laminar. Típicamente se inoculan de 2-4 g de callo en 50 ml de medio de crecimiento contenidos en matraces de 250 ml. La velocidad de agitación varía entre 100-160 rpm (1).

Puede generarse callo usando muchos tipos de explantes: segmentos de tallo, peciolo, mesófilo de hojas, ápices de raíz, hipocotilo, mesocotilo y pericarpo. Sólo un pequeño porcentaje de las células de

un explante contribuyen a la formación de callo, usualmente son células epidermales o células en contacto con el medio nutritivo. Entre estas células se establece un proceso de selección, algunas se dividen más rápido que otras; el tipo celular predominante depende de las condiciones de cultivo. A pesar de esto, los callos son masas heterogéneas compuestas por diversos tipos de células, entre otras, células proembriones iniciales, que pueden ser células aisladas o grupos multicelulares (38).

Puede distinguirse a las células embriogénicas por su apariencia, son células pequeñas y densas con núcleo y nucleolo grandes, alta densidad de ribosomas y proliferación de retículo endoplásmico. Los callos embriogénicos, es decir, aquellos que tienen células proembriones iniciales predominantes, son cafés y compactos, debido tal vez, a la alta cohesión de estas células indiferenciadas; tienen también, alto contenido relativo de agua y potencial hídrico elevado (12).

Ocasionalmente se producen algunos embriones asexuales en el medio de inducción de callo (11), pero en la gran mayoría de los casos, para producir diferenciación es necesario transferir el tejido a otro medio nutritivo.

La expresión de la embriogénesis requiere un medio nutritivo adecuado, los parámetros ambientales como luz y temperatura, parecen ser de importancia secundaria si se conocen las concentraciones óptimas de los reguladores y las sustancias nutritivas del medio de cultivo (40). El medio de desarrollo varía con la especie, puede ser

sin reguladores; con los mismos reguladores empleados en la inducción, pero en menor concentración; un medio sin reguladores y con una sustancia osmótica como manitol o glicerol (aunque la exposición prolongada a una sustancia osmótica puede ser inhibitoria); o bien, un medio adicionado con ácido abscísico (ABA). En cualquier caso, se agrega al medio una forma de nitrógeno reducido. El medio de desarrollo puede ser líquido o sólido, suelen obtenerse mejores resultados en medios líquidos (3, 6, 7, 13, 34, 42, 44). La variación en la respuesta puede explicarse porque la capacidad embriogénica está relacionada con la adquisición de un estado hormonal determinado por un balance específico entre diferentes hormonas endógenas. La presencia en el medio de cultivo de diferentes reguladores exógenos y otras sustancias como TDZ (Thidiazuron), tienen efecto inductor probablemente porque actúan modificando los niveles endógenos de ácido indolacético (AIA) y ácido abscísico (ABA) de diversas formas: activando o inhibiendo la síntesis, activando o inhibiendo el transporte, activando a estas hormonas o promoviendo su degradación (13,45).

En las nuevas condiciones de cultivo se inician una serie de cambios acelerados. Las células proembriones del callo transitan al estado embriogénico, cambian el arreglo de los microtúbulos, aumentan la velocidad de la división celular e incrementan de forma perceptible la síntesis de poliaminas (11,30). Los proembriones, que eran acúmulos de dos a cuatro células, se dividen; cuando alcanzan la talla de 31 a 47 μm (3 a 10 células), se establece el patrón morfológico de la

embriogénesis y puede considerarse a los agregados, embriones en estado globular (ver figura 1); después hay cambio de crecimiento isodiamétrico a expansión longitudinal, con lo cual se establece el estado oblongo; la emergencia de cotiledones marca el inicio del estado de corazón; cuando la diferenciación inicia el embrión se encuentra en la fase de torpedo, en este estado empieza la organización de los tejidos, aparecen los meristemas, se diferencian las células del xilema y surgen compartimentos para el almacenamiento de sustancias de reserva. Al término del proceso se tiene un embrión en estado cotiledonario (11, 15, 38).

La habilidad de las células somáticas de generar embriones pone en evidencia un potencial genético muy amplio. Estudios sobre la regulación genética de este potencial, muestran que la mayoría de los genes expresados durante la embriogénesis son activos en la planta madura, solamente un pequeño número de ellos son específicos de esta etapa o se encuentran más activos en este periodo de desarrollo (17). Los paquetes de genes específicos son expresados en diferentes estadios del desarrollo de la semilla y cada paquete tiene señales regulatorias que pueden intervenir en procesos transcripcionales o posttranscripcionales. La regulación se da incluso a nivel de interacción célula-célula. Se han encontrado proteínas componentes de la matriz extracelular y de la membrana plasmática de zanahoria y otras especies (9, 16, 25), que se comportan como mensajeros entre las células. Estas proteínas son controladas a su vez por las fitohormonas (49).

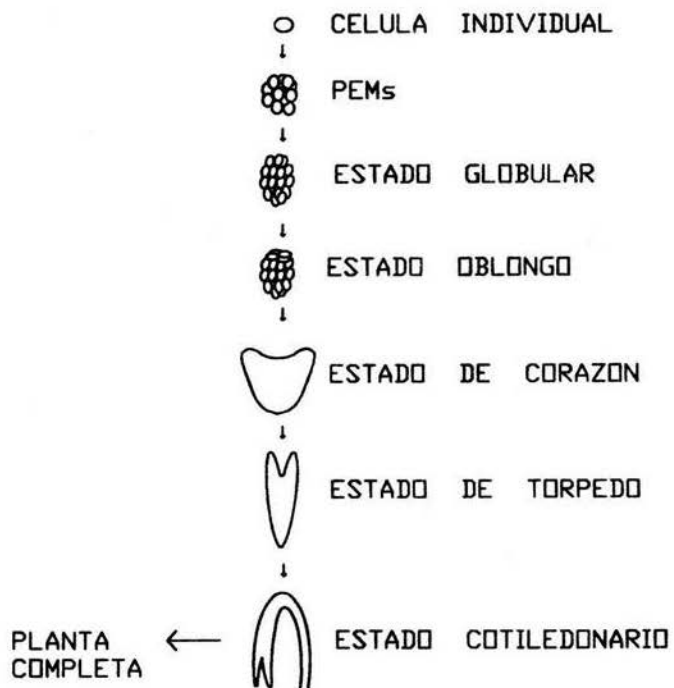


FIG. 1. ESTADOS SECUENCIADOS DEL DESARROLLO DE LOS EMBRIONES SOMATICOS, ADAPTADO DE PAYNE, ET AL. (1991).

Los embriones cotiledonarios pueden madurar, germinar y originar una planta completa, o pasar por un proceso de reinducción y formar otra generación de embriones.

Embriogénesis Avanzada.- Esta etapa del desarrollo de la semilla es la mejor conocida y comprende la embriogénesis tardía y el inicio de la germinación.

Para tener germinación y desarrollo posterior vigoroso, los embriones deben pasar por una etapa de maduración. Este estadio del embrión se caracteriza por la diferenciación celular acentuada que se evidencia en los siguientes eventos ontogénicos y fisiológicos: los compartimentos de almacen diferenciados en la etapa anterior, son llenados por acumulación de sustancias de reserva que son sintetizadas intensamente; mientras esto ocurre, los embriones crecen por expansión, llegando a su talla máxima y también cambian, se tornan opacos, los cotiledones se vuelven blancos y los embriones axilares adquieren una coloración amarilla (7). Poco después, se prepara al embrión para la latencia reduciendo los procesos metabólicos y eliminando agua de la semilla (15, 17).

En forma natural estos eventos ocurren para la mayoría de las dicotiledoneas en cinco estados secuenciados:

1) Estado de maduración.- Este es el periodo de acumulación de reservas, definido por la alta abundancia de RNAs mensajeros que codifican para las proteínas de almacenamiento. Los embriones alcanzan su talla máxima y el peso fresco más grande. Hacia la segunda mitad de este estado, el potencial hídrico empieza a declinar y la

concentración de ácido abscísico es muy alta.

2) Estado de postabscisión.- Es una fase sin crecimiento o con tasas de crecimiento mínimas. Ocurre la abscisión de conexiones vasculares que comunican al embrión con el óvulo. Este estado se define en el nivel molecular por la declinación de los RNAs mensajeros específicos de la maduración y el rápido incremento de los RNAs mensajeros específicos de postabscisión.

3) Estado de predesecación.- La única característica de esta etapa es la terminación de la transcripción.

4) Estado de desecación.- Este es un periodo de rápida declinación del contenido de agua de las células del embrión, hasta llegar a niveles cercanos a 110 g/kg de tejido.

5) Embrión maduro.- Embriones quiescentes.

A menudo los autores se refieren al proceso de embriogénesis como si se tratara de un proceso monolítico y llaman maduración a cualquiera de los estados antes mencionados. Para acabar con esta situación que afecta la comunicación, interpretación y evaluación de los experimentos, ha sido indispensable establecer una nomenclatura apropiada, reconocida por todos, tanto para los estadios embrionarios como para los marcadores genéticos de estas etapas (15).

Llamamos COT al estado cotiledonario, MAT al estado de maduración, ABA al periodo de altas concentraciones de ácido abscísico y declinación del potencial hídrico, el estado de postabscisión es PA y GRM la germinación temprana, que comprende 1-2 días después de la imbibición. La nomenclatura de los RNAs mensajeros de cada una de

estas etapas es: Mat (MAT), Lea (PA) y Grm (GRM).

El uso de esta nomenclatura ha mejorado mucho la comunicación, lo que nos ha ayudado a comprender mejor el papel que desempeñan el ácido abscísico, el ácido indolacético y los osmóticos en la regulación genética de la embriogénesis.

En el medio de desarrollo el ABA actúa como inductor, probablemente porque su adición al medio de cultivo causa disminución del ABA endógeno y la capacidad de embriogénesis está, tal vez asociada, con importante metabolización del ABA (12, 42,44). Durante la etapa de desarrollo las auxinas en altas concentraciones inhiben la embriogénesis. Se llegó a pensar que era por estimulación de la síntesis de etileno (30, 40), pero se comprobó que inhibidores de la biosíntesis de etileno o de su acción (AVG, AOA, ácido salicílico, CO₂+, Ag+) no revierten inhibición por 2,4-D. En cambio, la embriogénesis se inhibe con una sustancia que bloquea el transporte de auxinas - 2,3,5 ácido triiodobenzoico - (34). Los trabajos de Etienne, et al. (1993), sugieren que la disminución del AIA exógeno en el medio de desarrollo resulta en incremento de las concentraciones endógenas del AIA, lo cual parece inducir el proceso de embriogénesis.

La regulación en la embriogenesis avanzada siempre se correlacionó con la presencia de ABA, primero se pensó que actuaba por inhibición de crecimiento incontrolado (40). Después, en múltiples trabajos se demostró que el ABA mantiene el estado embriogénico, suprime la germinación precoz, interviene en el almacenamiento y distribución de sustancias de reserva y aumenta resistencia a la

deseccación (3, 6, 43).

A la presencia de osmóticos como sacarosa, manitol, PEG y glicerol, se le asignó un papel similar al del ABA e incluso se sugirió que el bajo potencial hídrico que estas sustancias ocasionan, es más importante que el ABA en la regulación de la transcripción durante la maduración (43).

Estudios específicos de cada estado de la embriogénesis avanzada, usando como marcadores genéticos los RNAs mensajeros de cada etapa (15), apuntan hacia la regulación desde el COT hasta la germinación temprana por cinco factores temporales que activan el desarrollo de tres programas genéticos. El programa MAT es mantenido por un factor endógeno regulado por algún agente vascular materno; el programa PA es inducido durante la abscisión - la expresión continua de este programa inhibe germinación y desarrollo de la semilla-, la terminación del programa PA parece estar autorregulada por una concentración crítica de las proteínas que él mismo codifica; la expresión del programa GRM requiere solamente imbibición.

Estos estudios muestran que el ABA parece ser requerido para la iniciación del estado de maduración y los eventos subsecuentes de la embriogénesis tardía, por su acción sobre el potencial hídrico que sirve para prevenir germinación, pero puede no ser necesario para el mantenimiento. Queda claro que la abscisión juega un papel central en el desarrollo tardío, terminación de la maduración y preparación del embrión para la desecación y los eventos tempranos de la germinación. Al parecer, la desecación por si misma no tiene un papel determinado

en el proceso (15).

Aplicaciones de la Embriogénesis Somática

La embriogénesis somática tiene algunas ventajas sobre otras formas de propagación vegetativa. Como los embriones tienen las dos regiones meristemáticas, requieren menos manipulación manual, ya que no es necesario inducir primero brotes y después raíz; los embriones son muy pequeños (menos de 1 mm) y por ello, son menos sensibles al daño físico; además, los embriones tienen alto potencial de desarrollo en procesos automáticos de propagación (38).

Por estas características se pueden producir semillas artificiales a través de embriogénesis somática. Para hacer esto posible se está trabajando en el desarrollo de técnicas eficientes que den embriones vigorosos y maduros (11, 38,). La embriogénesis adventicia puede ser también un medio de producción de sustancias normalmente asociadas con el cigoto, embrión o semilla, como es el caso de los lípidos del cacao (38).

ANTECEDENTES DE EMBRIOGENESIS EN PAPA.

Tal vez por ser la papa una planta que se propaga fundamentalmente por tubérculos, no ha surgido interés entre los botánicos en producir embriones somáticos de papa. Los únicos trabajos reportados sobre embriogénesis en esta especie, se refieren al desarrollo de embriones a partir de anteras para obtención de líneas celulares haploides (50).

Aunque la embriogénesis somática y la embriogénesis de anteras muestran el mismo patrón de desarrollo, no requieren los mismos medios de cultivo. Las anteras son células reproductivas, no es necesario inducir el crecimiento de callos de cierto tipo celular, las células espermáticas ya tienen las características requeridas y para obtener embriones es suficiente con sumergir los granos de polen en un solo medio, donde se cambie el programa gametofítico por el programa genético de la embriogénesis.

Por lo anterior, los trabajos sobre androgénesis en papa pueden servirnos de guía sólo en la composición de los medios para expresión de embriogénesis somática. Y en realidad, la ayuda que pueden brindarnos es muy poca porque los reguladores requeridos para la inducción de embriogénesis en anteras varían mucho.

Se ha encontrado efecto estimulante empleando una auxina (3.5 mg/l de AIA o 2 mg/l de 2,4-D), una citocinina (1 ó 3 mg/l de BAP) o combinando sustancias de ambos grupos (BA 1 mg/l y 2 mg/l de cinetina, BAP 1 mg/l y 0.1 mg/l de AIA). El ABA induce embriogénesis en altas concentraciones (4 mg/l), pero es menos eficiente que las auxinas y

citocininas. Hay una variación muy grande de respuesta entre cultivares haploides y tetraploides. La respuesta es también muy cambiante en las distintas variedades (32, 50).

Existen muchos medios para inducción de callo de papa reportados en la literatura (4, 11, 20), pero siempre el destino y las características esperadas de la masa celular son otras. El callo se produce como paso preliminar al crecimiento de brotes, raíces o cultivo de células en suspensión para otros fines.

Se emplean como explantes con buenos resultados: secciones de tallo, hojas y porciones de tubérculos. En todos los casos se usa el medio MS (1962). Las variaciones importantes se encuentran en los reguladores utilizados: una o dos auxinas (2,4-D y NAA), solas o acompañadas de una citocinina (BAP, BA o cinetina), e incluso de ácido giberélico (GA3). En algunos casos, se agregan además nutrientes complejos como agua de coco o hidrolizados de caseína (20). Entre esta diversidad encontramos, por fortuna, coincidencia en las concentraciones ocupadas. La concentración total de auxinas siempre es de 3 mg/l , la relación que guardan las concentraciones de auxinas y citocininas es de 10:1 y cuando se adiciona GA3, su concentración es de 0.4 mg/l.

Para cubrir la necesidad de semillas asexuales de papa obtenidas en condiciones asépticas y controladas, resulta necesario iniciar la investigación de embriogénesis adventicia en esta planta. El propósito del presente estudio fue encontrar por métodos empíricos los medios de cultivo más eficientes para la obtención de embriones somáticos

en papa (*Solanum tuberosum* L. var alfa) por embriogénesis indirecta.

Con los objetivos específicos que a continuación se anotan.

OBJETIVOS

GENERAL:

-Implementar una metodología para la inducción de embriogénesis en papa (*Solanum tuberosum* L. variedad alpha)

ESPECIFICOS:

-Estandarización de un medio nutritivo para inducción de callo embriogénico en papa.

-Obtención de cultivo de células en suspensión de papa.

-Probar el efecto de 2,4-D, cinetina y ácido abscísico en la expresión de embriogénesis somática en papa.

-Estandarización de un medio de cultivo óptimo para el desarrollo de embriogénesis somática en papa.

CONCLUSIONES DE LA REVISION BIBLIOGRAFICA

- 1.- La inducción de embriogénesis somática es un proceso complejo, dirigido por mecanismos múltiples: hormonales, nutricionales, ambientales y genéticos.
- 2.- Los parámetros ambientales son de importancia secundaria si se conoce la composición óptima del medio de cultivo.
- 3.- El medio más empleado en embriogénesis somática es el MS (1962).
- 4.- Hay dos formas de producción de embriones somáticos: embriogénesis directa y embriogénesis indirecta.
- 5.- La embriogénesis indirecta incluye una etapa de formación de callo.
- 6.- La embriogénesis somática se divide en dos etapas: embriogénesis temprana y embriogénesis avanzada.
- 7.- La embriogénesis temprana incluye dos pasos: inducción y expresión de embriogénesis.
- 8.- Se emplean medios distintos para la inducción y expresión de embriogénesis somática.
- 9.- Puede generarse callo empleando muchos tipos de explantes. En papa se utilizan porciones de callo, hoja y tubérculos.
- 10.- La iniciación de crecimiento de callo se hace en medio semisólido, la proliferación celular en medio líquido.
- 11.- Las auxinas parecen ser un factor limitante en la inducción de embriogénesis somática.
- 12.- En la mayoría de los casos la auxina empleada es 2,4-D.
- 13.- Para inducción de callo en papa se emplean: una o dos auxinas,

solas o acompañadas de una citocinina y en algunos casos de ácido giberélico. La concentración total de auxinas es de 3 mg/l; los radios utilizados de auxinas-citocininas son 10:1; cuando se adiciona ácido giberélico su concentración es de: 0.4 mg/l.

14.- Para establecer un cultivo en suspensión, se emplean entre 2 y 4 g de callo en 50ml de medio de cultivo.

15.- Los medios de expresión de embriogénesis somática presentan las siguientes variantes:

a) Medio básico sin reguladores.

b) Medio básico con una concentración menor de los medios empleados en la etapa de inducción.

c) Medio básico sin reguladores y con altas concentraciones de una sustancia osmótica.

d) Medio básico con ABA.

e) Medio básico con ABA y con una concentración menor de los reguladores de crecimiento usados en la etapa de inducción.

16.- Se obtienen mejores respuestas en medios de expresión de embriogénesis líquidos.

17.- La embriogénesis avanzada comprende tanto la embriogénesis tardía como el inicio de la germinación.

18.- La embriogénesis avanzada ocurre en cinco estados secuenciados: maduración, postabscisión, predesecación, desecación y embrión maduro.

METODOLOGIA

Material Vegetal

Este trabajo se desarrolló con tubérculos de papa (Solanum tuberosum L. variedad alpha), obtenidos en el Programa CODAGEM (INIFAP), Metepec, Edo. de Mexico. Los tubérculos fueron plantados en macetas con suelo arenoso para inducir brotes. Cinco semanas después, cuando las plantas alcanzaron aproximadamente 25 cm. de altura, se cortaron secciones de tallo de 2 cm de largo con entrenudos y hojas enteras.

Desinfestación

Los tejidos se lavaron con agua corriente y se sumergieron en etanol al 96% durante 60 segundos, después se introdujeron durante 20 minutos en una solución de Tritón 80 al 0.05% e hipoclorito de sodio al 1.5% para las hojas y al 3% para los tallos. En una campana de flujo laminar se removió la solución; con ayuda de unas pinzas se pasaron los explantes a un vaso de precipitados estéril y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Con un bisturí se removieron los extremos de los tallos y se cortaron las hojas en secciones de 1.0 x 1.5 cm. Por último, los inóculos se pasaron a una caja petri estéril. El material vegetal quedó así listo para ser sembrado en el medio de inducción de callo.

Medio Básico

El proceso de inducción de embriogénesis somática se efectuó en 2 etapas: inducción de callo embriogénico y desarrollo de

embriogénesis. En las dos etapas se usó un medio básico que contenía: micro y macro-nutrientes Murashige y Skoog (1962), glicina (1 mg/l), tiamina-HCl (1 mg/l), piridoxina-HCl (1 mg/l), ácido nicotínico (1 mg/l), sacarosa (20 g/l), Na₂ EDTA (19 mg/l), FeSO₄ · 7 H₂O (14 mg/l), mioinositol (100 mg/l) y sólo para el medio de inducción de callo, agar-agar (7 g/l). Se ajustó el pH del medio a 6.0 con HCl y KOH 1N y se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 120 ° C.

Inducción de Callo Embriogénico

El experimento inicial consistió en la estandarización del medio para inducción de callo embriogénico. En medio semisólido se probaron 4 tratamientos que consistieron en medio básico con: 1) 3 mg/l de 2,4-D; 2) 3 mg/l de 2,4-D y 0.3 mg/l de cinetina; 3) 3 mg/l de 2,4-D, 0.3 mg/l de cinetina y 0.4 mg/l de ácido giberélico; y 4) 1 mg/l de 2,4-D y 1 mg/l de cinetina (Ver tabla 1). Cada tratamiento se aplicó tanto a fracciones de tallo como a porciones de hojas. Los explantes se colocaron en frascos de 150 ml que contenían 25 ml de medio semisólido en las siguientes condiciones de cultivo: 20-25 ° C, en fotoperiodo corto (8 h luz / 16 h oscuridad), bajo lámparas fluorescentes con una radiación luminosa de 25 µE/m² S. Se manejaron 5 repeticiones por tratamiento.

Después de cuatro semanas en tratamiento en medio semisólido para inducción de callo, se observó la aparición del material celular (color y friabilidad), se tomó peso fresco por tratamiento, se hicieron cortes histológicos en fresco y se observaron al microscopio. Se fraccionaron los callos restantes y se transplantaron para

MEDIO	R E G U L A D O R E S
1	2,4-D 3 mg/l
2	2,4-D 3 mg/l, Cinetina 0.3 mg/l
3	2,4-D 3 mg/l, Cinetina 0.3 mg/l, GA ₃ 0.4 mg/ml
4	2,4-D 3 mg/l, Cinetina 3 mg/l

TABLA 1.- CONCENTRACIONES DE REGULADORES DE CRECIMIENTO EMPLEADAS EN LOS MEDIOS PARA INDUCCION DE CALLO, TANTO LIQUIDOS COMO SEMISOLIDOS.

obtener mayor volumen de callo por volumen de tejido. El callo contenido en un frasco se transplantó a dos frascos con medio fresco. 28 días más tarde se contaba con material suficiente para establecer los cultivos en suspensión.

Cultivo en Suspensión

Se subcultivaron porciones de callo de 1-2 g (intentando agregar sólo callo) dentro de matraces Erlenmeyer de 125 ml que contenían 50 ml del mismo medio en el cual fue inducido el callo, pero sin agar-agar. Los matraces se mantuvieron en las mismas condiciones de cultivo antes descritas, durante cuatro semanas, en un agitador orbital de flujo laminar a 100, 120 y 150 rpm. Se manejaron dos repeticiones por tratamiento. Para cada cultivo se elaboró una cinética de crecimiento celular, estimada en base a volumen de paquete celular relacionado con peso fresco. El paquete celular se determinó en tubos Ependorff con 1 ml de cultivo centrifugado a 15 000 rpm., durante 10 min. La respuesta en esta primera fase experimental se evaluó: por la apariencia del callo a simple vista -color y grado de friabilidad-, peso fresco de tallo por tratamiento, presencia de células proembrionarias en cortes histológicos y en los cultivos en suspensión y por la cinética de crecimiento en los medios líquidos.

Los callos en suspensión de la mejor respuesta, se subcultivaron usando una dilución de proporción 1:1, reemplazando la mitad del volumen del medio nutritivo con medio fresco; transcurridas 2 semanas -cuando se encontraban en la fase exponencial- volvieron a subcultivarse usando nuevamente una dilución de proporción 1:1. Los

cultivos se mantuvieron en las mismas condiciones de iluminación y temperatura, en un agitador orbital (LAB - LINE INSTRUMENTS, Inc.) a 120 rpm. Después de dos semanas se contó con material vegetal suficiente para continuar con la segunda fase experimental de este trabajo.

Desarrollo de Embriogénesis Somática

Las células en suspensión del tratamiento 2 se filtraron en mallas de acero inoxidable, 200 mesh (Haver & Boecker), bajo condiciones estériles, para retirar el medio de inducción; se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se transplantaron a matraces Erlenmeyer de 125 ml que contenían 50 ml de medio de desarrollo. Se inoculó en cada matraz de 1 a 1.5 g de células para lograr una concentración inicial de 20 a 30 mg/ml. Los matraces se mantuvieron en las condiciones ambientales antes mencionadas, en agitador orbital a 120 rpm. En todos los casos se manejaron dos repeticiones por tratamiento.

Primer experimento.- Inicialmente se probaron cuatro medios para desarrollo de embriogénesis: A) Medio básico (MB) sin reguladores; B) MB con 1.5 mg/l de 2,4-D y 0.15 mg/l de cinetina; C) MB con 28 μ g/l de ABA; y D) MB con 1.5 mg/l de 2,4-D, 0.15 mg/l de cinetina y 28 μ g/l de ABA (Ver tabla 2). A todos los medios se les adicionó además, glicina 16 μ M como fuente de extra de nitrógeno reducido. Transcurridas cinco semanas se evaluó la respuesta por la presencia o ausencia de embriones en el medio de cultivo.

Segundo experimento.- La ausencia de embriones en los cuatro

MEDIO	COMPOSICION
A	MB
B	MB, 2,4-D 1.5 mg/l, Cinetina 0.15 mg/l
C	MB, ABA 28 _μ g/l
D	MB, 2,4-D 1.5 mg/l, Cinetina 0.15 mg/l, ABA 28 _μ g/l

TABLA 2.- COMPOSICION DE LOS MEDIOS USADOS EN EL PRIMER EXPERIMENTO DE DESARROLLO DE EMBRIOGENESIS SOMATICA.

tratamientos empleados hizo necesario probar con otras concentraciones de reguladores. Para facilitar el diseño se decidió trabajar primero solamente con 2,4-D y cinetina. Se disminuyó ligeramente la relación de auxina-citocinina de 10:1 a 6:1 y se manejaron tres concentraciones menores : I) 1 mg/l de 2,4-D y 0.15 mg/l de cinetina; II) 0.5 mg/l de 2,4-D y 0.08 mg/l de cinetina; y III) 0.25 mg/l de 2,4-D y 0.04 mg/l de cinetina. Se decidió probar también con la relación invertida de los reguladores: citocinina-auxina 6:1, en las mismas concentraciones: IV) 1 mg/l de cinetina y 0.15 mg/l de 2,4-D; V) 0.5 mg/l de cinetina y 0.08 mg/l de 2,4-D; y VI) 0.25 mg/l de cinetina y 0.04 mg/l de 2,4-D (Ver tabla 3). Para probar el efecto de los reguladores sobre la morfología de las células, se hizo una caracterización del cultivo celular. Las fotografías de las células se tomaron en un microscopio Nikon (Autophot). Se calificó en relación con la abundancia de células embriogénicas, después de cinco semanas de tratamiento.

Tercer experimento.- También se trabajó con los elementos no hormonales del medio. Con la mejor respuesta del experimento anterior - V -, probamos el efecto de: la concentración de las sales minerales, la presencia de osmóticos y la concentración de nitrógeno reducido, sobre la morfología de las células en suspensión. Probamos también el efecto combinado de los factores antes mencionados con otros reguladores de crecimiento (AIA, BAP). Para lo cual se manejaron los siguientes medios: R1) MB; R2) ME con 0.5 mg/l de cinetina y 0.08 mg/l de 2,4-D, R3) 1/2 de las sales MS con y vitaminas MS; R4) 1/2 de las

MEDIO	REGULADORES	
	2,4-D mg/l	CINETINA mg/l
I	1.0	0.15
II	0.5	0.08
III	0.25	0.04
IV	0.15	1.0
V	0.08	0.5
VI	0.04	0.25

TABLA 3.- MEDIOS EMPLEADOS EN EL SEGUNDO EXPERIMENTO PARA LOGRAR EL DESARROLLO DE EMBRIONES SOMATICOS EN PAPA. A TODOS LOS MEDIOS SE LES AGREGO ADEMAS, GLICINA 16 μ M COMO FUENTE ADICIONAL DE NITROGENO REDUCIDO.

sales MS, vitaminas MS, 0.5 mg/ de cinetina y 0.08 mg/ de 2,4-D; 5R) MB con maltosa 6%; R6) 1/2 de las sales MS, vitaminas MS y maltosa 6%; R7) 1/2 de las sales MS con tiamina*HCl 1 mg/l, maltosa 6%, BAP 1 mg/l y AIA 0.1 mg/l (ver tabla 4). A todos los medios se les adicionó además: sacarosa 6%, 400 mg/l de NH_4NO_3 y 750 mg/l de glutamina. La respuesta se midió, con base en el inventario celular, por la abundancia de células embriogénicas.

Cuarto experimento.- La ausencia de embriones hizo necesario probar con otras concentraciones de reguladores. Realizamos un experimento con diseño factorial completamente al azar (ver tabla 5), empleando los factores no hormonales que dieron la mejor respuesta en el experimento anterior - R5 -. Con tal proposito se aplicaron los doce tratamientos que a continuación se describen: T1) 1 mg/l de cinetina; T2) 2 mg/l de cinetina; T3) 3 mg/l; de cinetina; T4) 1 mg/l de cinetina y 1mg/l de de 2,4-D; T5) 2 mg/l de cinetina y 1 mg/l de 2,4-D; T6) 3 mg/l de cinetina y 1 mg/l de 2,4-D; T7) 1 mg/l de cinetina y 2 mg/l de 2,4-D; T8) 2 mg/l de cinetina y 2 mg/l de 2,4-D; T9) 3 mg/l de cinetina y 2 mg/l de 2,4-D; T10) 1 mg/l de cinetina y 3 mg/l de 2,4-D; T11) 2 mg/l de cinetina y 3 mg/l de 2,4-D; T12) 3 mg/l de cinetina y 3 mg/l de 2,4-D. El efecto se evaluó por abundancia de células embriogénicas en los cultivos, después de cuatro semanas de tratamiento.

MEDIO	COMPOSICION DEL MEDIO						
	MB	1/2 MB	2,4-D 1.5 mg/L CINETINA 0.15 mg/L	GLUTAMINA NH ₄ NO ₃	GLUCOSA 6%	MALTOSA 6%	BAP 1 mg/L IAA 1 mg/L
R1	+	-	-	+	+	-	-
R2	+	-	+	+	+	-	-
R3	-	+	-	+	+	-	-
R4	-	+	+	+	+	-	-
R5	+	-	+	+	+	+	-
R6	-	+	+	+	+	+	-
R7	-	+	-	+	+	+	+

TABLA 4.- COMPOSICION DE LOS MEDIOS EMPLEADOS EN EL TERCER EXPERIMENTO PARA
 EL DESARROLLO DE EMBRIONES SOMATICOS EN PAPA. TODOS LOS MEDIOS CONTENIAN: CINETINA
 0.5 mg/l Y 2,4-D 0.06 mg/l.

mg/l		CINETINA		
		1	2	3
2	0	T1 CIN :1 2,4-D:0	T2 CIN :2 2,4-D:0	T3 CIN :3 2,4-D:0
	1	T4 CIN :1 2,4-D:1	T5 CIN :2 2,4-D:1	T6 CIN :3 2,4-D:1
4	2	T7 CIN :1 2,4-D:2	T8 CIN :2 2,4-D:2	T9 CIN :3 2,4-D:2
	D	T10 CIN :1 2,4-D:3	T11 CIN :2 2,4-D:3	T12 CIN :3 2,4-D:3

TABLA 5.- DISEÑO FACTORIAL COMPLETAMENTE AL AZAR CON EL QUE SE EFECTUO EL CUARTO EXPERIMENTO PARA EL DESARROLLO DE EMBRIONES SOMATICOS DE PAPA. SE MUESTRAN LAS CONCENTRACIONES DE REGULADORES EMPLEADAS EN CADA TRATAMIENTO. EN TODOS LOS CASOS SE UTILIZO: 1/2 DE LAS CONCENTRACIONES DE MB, NH_4NO_3 400 mg/l, L-GLUTAMINA 750 mg/l, SACAROSA 6% Y MALTOSA 6%.

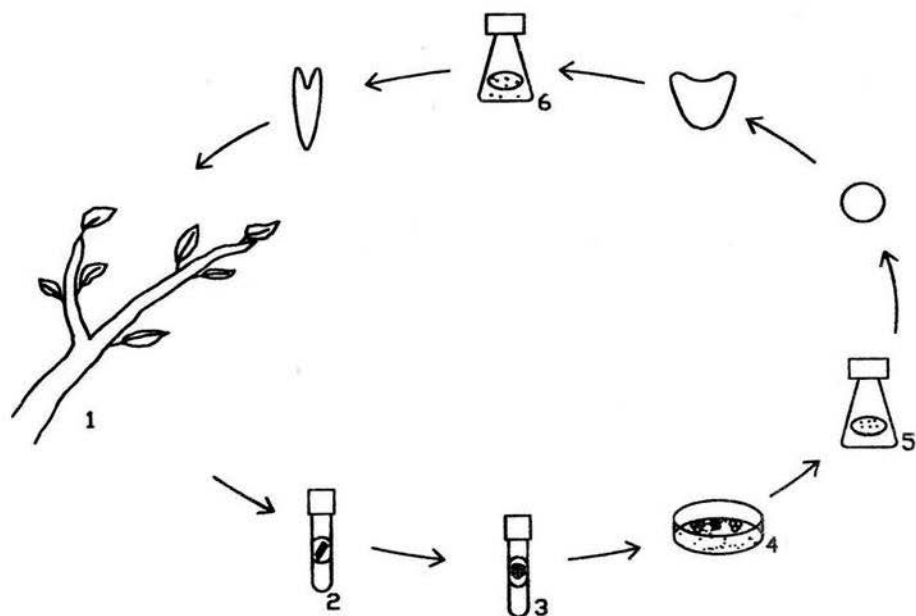


FIG. 2. TECNICA PARA INDUCCION DE EMBRIOGENESIS SOMATICA EN PAPA, LA SECUENCIA SEGUIDA INCLUYE LOS SIGUIENTES PASOS: 1) PLANTAS MADURAS DE PAPA PROVEEN HOJAS Y TALLOS COMO EXPLANTES. 2) LOS EXPLANTES SE DESINFESTAN Y SE INOCULAN EN MEDIO SEMISOLIDO PARA INDUCCION DE CALLO. 3) DESPUES DE CUATRO SEMANAS SE TRASLADAN LOS CALLOS A MEDIO FRESCO. 4) LOS CALLOS SE FRACCIONAN Y SE INOCULAN EN UN MATRAZ CON MEDIO LIQUIDO. 5) DESPUES DE NUEVE SEMANAS LAS CELULAS SE TRANSFIEREN A UN MEDIO DE DESARROLLO. 6) FINALMENTE SE GENERAN EMBRIONES EN ESTADO DE TORPEDO.

RESULTADOS



RESULTADOS Y DISCUSION

Desinfestación

La formación de callo empezó a ser evidente a los siete días de iniciado el tratamiento, en todos los medios, tanto en los explantes de hoja como en los de tallo. En los días siguientes se manifestó paulatinamente contaminación por bacterias en los frascos inoculados con tallo. En cambio, los frascos con hoja no presentaron contaminación en ningún caso.

Todos los explantes se desinfestaron al mismo tiempo y con la misma solución (hipoclorito de sodio 1.5 %), esto nos hizo pensar que la contaminación era un problema sistémico del tallo. Probablemente las bacterias quedaban protegidas del hipoclorito en los entrenudos, porque la contaminación tardaba en presentarse alrededor de dos semanas, tiempo en el cual, pudieron trasladarse desde las regiones meristemáticas hasta el exterior del implante.

El porcentaje tan alto de tallos contaminados (84 %), hizo necesario repetir el experimento. En esta ocasión, el material vegetal se desinfestó -siguiendo la técnica explicada en la metodología-, utilizando una solución de hipoclorito de sodio al 3%. Las hojas no soportarían esta concentración. Fueron tratadas, igual que en el caso anterior, con una solución al 1.5%.

No fue posible sembrar sólo explantes de tallo sin nudos (aunque la mayoría lo eran), porque los tallos empleados los tenían muy cercanos y el número de plantas con que contábamos - diez-, no alcanzaban a cubrir este requerimiento. El desinfectante empleado en

-esta concentración dañaba mucho el extremo de los implantes y ocasionaba la pérdida de casi un cm. de material celular. Por eso fue necesario cortar secciones de aproximadamente 2.5 cm. para conseguir explantes de alrededor de 1.5 cm. De esta forma logramos abatir la contaminación en todos los casos, inclusive cuando se manejaron porciones de tallo con nudos.

Inducción de callo en medios semisólidos.

Encontramos formación de tejido desorganizado en los cuatro medios semisólidos usados para inducción de callo. Los callos que resultaron en cada tratamiento presentaron variación en rendimiento (peso fresco), color, consistencia y tipos celulares presentes. (Ver Tablas 6A y 6B).

En todos los tratamientos, la presencia de nudos resultó en el desarrollo, primero de brotes y más tarde de raíces. Aunque siempre se formó también callo, éste presentó un crecimiento menor que el de los frascos inoculados con tallo libre de nudos, porque tenía que competir por los nutrientes y el espacio con las formas de crecimiento organizado.

Si bien, no hubo diferencia en aspecto y color entre los callos obtenidos a partir de tallo y de hoja, no ocurrió lo mismo con los rendimientos. La eficiencia de formación de callo es mucho mayor cuando se emplean segmentos de tallo como explantes. No pudimos comparar los cortes histológicos porque con la técnica convencional de parafina, el tejido desorganizado se desprende, resultó muy blando para el criotomo y los callos de hoja, fueron demasiado delgados para

MEDIO	COLOR	CONSISTENCIA	PESO FRESCO
1	TALLO	TRANSPARENTE CON ZONAS BLAQUECINAS.	MUY FRIABLE Y ESPONJOSO 1.4 g/frasco
	HOJA	BLANCO TRANSPARENTE	MUY FRIABLE Y ESPONJOSO 0.2 g/frasco
2	TALLO	TRANSPARENTE Y VERDOSO ABUNDANTES ZONAS BLAN- QUECINAS.	FRIABLE 1.5 g/frasco
	HOJA	VERDOSO TRANSPARENTE	FRIABLE 0.8 g/frasco
3	TALLO	PARDO Y VERDOSO	CRECIMIENTO EN REGIONES CIRCULARES. COMPACTO. 2.3 g/frasco
	HOJA	CAFE Y VER- DOSO, OPACO.	CRECIMIENTO EN PEQUEÑAS ZONAS CIRCULARES. COMPACTO. 0.6 g/frasco
4	TALLO	PARDO VERDO- DOSO Y BLAN- QUECINO.	CRECIMIENTO ESCASO EN ZO- NAS CIRCULARES. MUY COMPACTO 1.6 g/frasco
	HOJA	VERDE, PARDO Y TRANSPA- RENTE	CRECIMIENTO EN LA ORILLA DE LAS HOJAS. MUY COMPACTO. 0.4 g/frasco

TABLA 6A.- RESPUESTA DE LOS EXPLANTES DE HOJA Y TALLO A LOS CUATRO MEDIOS DE INDUCCION DE CALLO EMBRIOGENICO DESPUES DE 30 DIAS DE TRATAMIENTO. EL EFECTO SE EVALUO POR: APARIENCIA DEL CALLO (COLOR Y CONSISTENCIA) Y CON PESO FRESCO POR TRATAMIENTO. LA CONSISTENCIA REPORTADA SE PRESENTO INVARIABEMENTE EN TODOS LOS TRATAMIENTOS. EN CADA CASO SE ANOTAN TODAS LAS COLORACIONES OBTENIDAS.

MEDIO	CORTE HISTOLOGICO	CULTIVO EN SUSPENSION
1 TALLO HOJA	CALLO DE PERENQUIMA MUY ESPONJOSO, ZONAS BLANCAS CON CELULAS PEQUEÑAS POCO ABUNDANTES.	GRUPOS DE CELULASA GRANDES Y VACUOLADAS, OTROS DE CELULAS PEQUEÑAS. ABUNDANTES CELULAS LIBRES MUY GRANDES, DE DIVERSAS FORMAS.
2 TALLO HOJA	CALLO MUY DIVERSO.GRAN DESORGANIZACION DESPUES DEL CILINDRO CENTRAL.HAY CELULAS DE PARENQUIMA, XILEMA Y CELULAS PEQUEÑAS CON NUCLEOS MUY GRANDES.	GRAN CANTIDAD DE CELULAS LIBRES:GRANDES Y CHICAS;REDONDAS, LARGAS Y OVALADAS. CELULAS PEQUEÑAS Y COMPACTAS,MEHOS ABUNDANTES, AGRUPADAS.
3 TALLO HOJA	GRAN DIVERSIDAD CELULAR.CALLOS FORMADOS POR CELULAS DE PARENQUIMA, XILEMA, FLOEMA Y COLENGUIMA Y ABUNDANTES CELULAS MERISTEMATICAS.	CELULAS GRANDES, REDONDAS, OVALADAS, TRIANGULARES, DE FORMAS EXTRAÑAS, CON EVAGIMACIONES. SON MUY GRANDES Y VACUOLADAS.
4 TALLO HOJA	EN LAS ZONAS CON CALLO HAY GRAN DIVERSIDAD CELULAR. PERO LA MAYOR PARTE DE LA MASA CELULAR LA OCUPA CRECIMIENTO DE TEJIDO ORGANIZADO.	MUY POCAS CELULAS EN SUSPENSION. LAS QUE HAY SON PEQUEÑAS Y REDONDAS MUY TRUGENTES. ABUNDANTES RESTOS DE CELULAS ROTAS.

TABLA 6B.- RESPUESTA DE LOS EXPLANTES DE HOJA Y TALLO A LOS CUATRO MEDIOS DE INDUCCION DE CALLO EMBRIOGENICO. EL EFECTO SE EVALUO POR: LOS TIPOS CELULARES ENCONTRADOS EN LOS CORTES HISTOLOGICOS DE CALLO Y POR LAS CELULAS PRESENTES EN EL CULTIVO EN SUSPENSION DESPUES DE CUATRO SEMANAS DE ESTABLECIDO.

los cortes en fresco.

En las plantas dicotiledoneas existen zonas meristemáticas tanto en hojas como en tallos, la diferencia de respuesta no puede explicarse por este factor. En el explante, las zonas donde se forma callo suelen ser las que están en contacto directo con el medio de cultivo. Por presentar mayor superficie de exposición al medio se pensaría que las hojas tendrían ventaja sobre los tallos. No ocurrió así, seguramente por la acción de otro factor, que tal vez sea el mayor número y diámetro de los tejidos de conducción en los tallos; que puedan estar determinando mayor velocidad de nutrientes y reguladores de crecimiento en el tejido.

En los tratamientos 3 y 4 el callo resultó compacto y oscuro, esta era la morfología que estábamos esperando. En prácticamente toda la literatura consultada se reporta que los callos embriogénicos presentan esta característica. Por desgracia, el crecimiento era muy escaso, en pequeñas zonas circulares. En los dos casos, los cortes histológicos mostraron gran diversidad celular : células de parénquima, xilema, floema y colénquima y algunos grupos de células pequeñas y compactas.

Como caso opuesto se presentó el del tratamiento 1. El callo era sumamente esponjoso y friable, con regiones blanquecinas escasas, donde se apretaban grupos de células pequeñas y densas. En los cortes histológicos se apreció que la gran mayoría de la masa celular la componían células de parénquima muy vacuoladas y grandes en extremo.

Una respuesta intermedia se encontró con el callo desarrollado

en el medio 2. Era transparente, con frecuentes zonas blanquecinas -probablemente meristemáticas-; su consistencia, muy buena, friable, pero manejable; con tejido, muy diverso, rico en células parenquimáticas, de xilema y floema; las células pequeñas con núcleos muy grandes y coloreados eran más abundantes en este tratamiento.

Se encontró mayor rendimiento de peso fresco en el medio 3, en el caso de los tallos y en el medio 2, en el de las hojas. Esta medición se hizo con toda la masa celular que se encontraba en las unidades experimentales después de 30 días de tratamiento y no solamente con los tejidos desorganizados, por dos razones: en primer lugar, hubiera sido muy difícil separar los callos del tejido organizado porque no había límites identificables; además, íbamos a usarlos para el cultivo en suspensión y con tanto manejo se hubieran contaminado.

A la semana de iniciado el cultivo había ya presencia de tumoraciones. La respuesta más lenta se dió en el medio 1, alrededor del doceavo día de tratamiento, cuando el callo era ya abundante en los otros medios. Pero una vez presente, creció mucho más rápido que los demás, de tal manera que al cumplirse 30 días era el más voluminoso de todos. Este era también el callo más esponjoso, por eso el peso fresco no da una idea muy clara de su abundancia. Otro caso donde no se refleja muy bien la abundancia de callo por el peso fresco es el del medio 3. Los explantes cultivados en él, experimentaron en los primeros días del cultivo (al mismo tiempo que se desarrollaba callo), crecimiento acelerado del tejido organizado, que duplicó, e

incluso triplicó su volumen - sobre todo en el caso de los tallos-. Este crecimiento acelerado puede explicarse por la presencia en el medio de cultivo de GA3 .

Esperabamos encontrar callos en todos los tratamientos porque habían sido empleados con este fin en otras investigaciones, de cualquier forma sorprende que haya respuesta lo mismo en medios donde se encuentra la auxina sola, o su relación con la citocinina es diez veces mayor (medios 1,2 y 3), que en un medio donde se encuentra en la misma proporción que la citocinina. Lo que da una idea del rango tan amplio de condiciones en que se puede inducir un proceso. Esto puede explicarse de dos formas: la papa como respuesta a un corte, reacciona espontáneamente formando callo, o bien, el proceso se desencadena con una concentración alta de auxinas en el medio de cultivo, independientemente de la presencia de otros reguladores de crecimiento. También resulta sorprendente que en un explante colocado en las mismas condiciones haya respuestas tan distintas (brotes, raíces y callo). La acción de los reguladores sobre el explante esta variando de forma sustancial en los distintos tipos celulares que presenta. Estas dos situaciones muestran porque es tan difícil obtener un resultado deseado en el cultivo de tejidos, los niveles tan empíricos en los que nos movemos y lo mucho que nos hace falta conocer para hacer estos sistemas un poco más predecibles.

La necesidad de auxinas para el desarrollo de callos a partir de un explante es generalizada para casi todas las plantas, aunque en algunos casos es posible inducir callo con citocininas solas. La

concentración de 2,4-D utilizada parece ser adecuada.

La presencia de citocininas en los medios de cultivo (medios 2,3 y 4), aparentemente ocasiona mayor diversidad celular en los callos. En el medio 1, donde se adicionó solamente 2,4-D el parénquima es casi la única especie celular presente. La presencia de ácido giberélico no parece afectar ni la abundancia ni la composición del callo, en cambio, hace crecer en extremo a los tejidos organizados y retarda la respuesta. Además la presencia de este tipo de hormona vegetal parece ser perjudicial en la etapa de desarrollo de embriogénesis somática.

Establecimiento de cultivos en suspensión de callo

Hicimos un ensayo preliminar de dos días, con tres diferentes velocidades de agitación: 100, 120 y 150 rpm. En el primer caso prácticamente no hubo dispersión celular en los medios líquidos. Con la velocidad de agitación mayor, las células se dispersaban muy rápido en la fase líquida, pero no soportaban las fuerzas de corte generadas, se reventaban y de igual manera no se establecía el cultivo. Con 120 rpm, se conseguía una velocidad razonable de dispersión sin causar daño a las células. Este parámetro no se pudo medir con el callo del medio cuatro porque no conseguimos establecer el cultivo en suspensión con ninguna de las velocidades de agitación probadas.

En el caso de las hojas, para contar con la cantidad requerida de material vegetal (2-4 g por frasco), fue necesario ocupar todos los callos con que contábamos y de cualquier forma el establecimiento fue muy tardado e ineficiente. Se empezaron a observar células en

suspensión hasta el final de la tercera semana y la concentración fue siempre tan baja que resultó imposible elaborar cinéticas de crecimiento.

Aunque no tanto como en hojas, la eficiencia de los callos de tallo para el establecimiento del cultivo en suspensión fue baja. Después de dos semanas en cultivo líquido había células aisladas, pero el mayor crecimiento se dió alrededor de los trozos de callo que agregamos.

Para poder evaluar la respuesta era necesario un cultivo mucho más abundante. A pesar de que adicionamos la cantidad de tejido que especificaba la técnica, ésta correspondía más al peso del tejido organizado que al del callo. Esta situación se agravaba en el caso de los callos de hojas, donde el crecimiento se circunscribía a una pequeña región alrededor de la epidermis. Decidimos intentarlo de nuevo, pero ahora sólo con tallos.

Probamos transplantando el callo a medio fresco (medio semisólido), después de cuatro semanas de tratamiento. Al hacerlo, cortamos las masas celulares en segmentos de 0.5 x 0.5 cm. y colocamos dos segmentos por frasco. Los callos crecieron aceleradamente en todos los casos y después de dos semanas, había material suficiente para iniciar los cultivos en suspensión.

Antes de ser agregados al medio líquido, los callos se fraccionaron cuidadosamente, intentando separarlos del otro material vegetal; cuando teníamos sólo callo, lo cortamos en porciones lo más pequeñas posible. De esta manera conseguimos establecer el cultivo en

suspensión en dos o tres días y el crecimiento fue tan acelerado, que dos semanas más tarde, fue necesario transplantar a medio fresco (con excepción del tratamiento 4, que permaneció cuatro semanas en los mismos matraces).

En los cultivos en suspensión de los medios 1, 2 y 3, eran predominantes: células parenquimatosas extremadamente grandes y vacuoladas, de muy diversas formas -redondas, ovaladas, triangulares e irregulares-. En el medio 1, ésta era casi toda la población celular, aunque había otras células pequeñas y densas que se encontraban en grupos muy escasos. En los medios 2 y 3 había además muchas células de xilema y floema muy largas y células deformes con evaginaciones y crecimientos diversos. Estas células eran muy frecuentes en el medio 3, donde las deformaciones se presentaban en todos los tipos celulares presentes.

Después de cuatro semanas en el medio líquido, el callo del tratamiento 4, se disgregó muy poco, la mayoría de las células que se liberaron se habían colapsado; las que aún permanecían en suspensión, eran redondas, pequeñas y muy turgentes. En cambio los callos que fueron inoculados experimentaron crecimiento abundante en la superficie. Como no se consiguió nunca una concentración celular adecuada, no fue posible efectuar la cinética de crecimiento para este tratamiento.

Para medir la cinética de crecimiento es necesario que el cultivo permanezca todo el tiempo de medición en el mismo recipiente, sólo así se pueden detectar las diferentes velocidades de reproducción

que son resultado de la adaptación de las células a las condiciones del medio. Para conseguir menores tasas de crecimiento, se redujo la cantidad de inóculo (1-1.5 g/frasco) y se fraccionó menos. En el medio cuatro se siguió utilizando la concentración celular anterior.

El cultivo de células en suspensión de los tratamientos 2 y 3 tuvieron la misma cinética de crecimiento. Con el medio, 1, el cultivo en suspensión presentó mayor productividad que en los casos restantes: 0.130 g/l en 32 días contra 0.096 g/l en 32 días, en los otros dos tratamientos (Ver Figs. 3 y 3A). Las velocidades de crecimiento calculadas para la fase de exponencial son muy similares: 0.00625 g de células/l día, en el medio 1 y 0.00675 g de células /l día, en los medios 2 y 3. Lo que da tiempos de duplicación de 111 y 103 días respectivamente. La fase lag (fase de adaptación), es menos prolongada en el medio 1, el crecimiento exponencial se alcanza alrededor del día 20 de cultivo, mientras en el otro caso se alcanza después de 28 días.

La similitud de velocidades de crecimiento, pone en evidencia que en realidad, en todos los casos el cultivo de células de papa se está comportando igual, las diferencias en rendimientos y en la fase lag, se deben más al tamaño del inóculo que al efecto del medio sobre las células. Puede notarse que con pequeños incrementos la productividad es mucho mayor, pero también el medio se satura mucho más rápido; porque en el medio 1, para el día 32, tenemos ya fase estacionaria. Por lo anterior, la cinética de crecimiento no fue un parámetro a utilizar en la elección del mejor medio para inducción de callo embriogénico, de cualquier forma nos resultó útil pues indicó

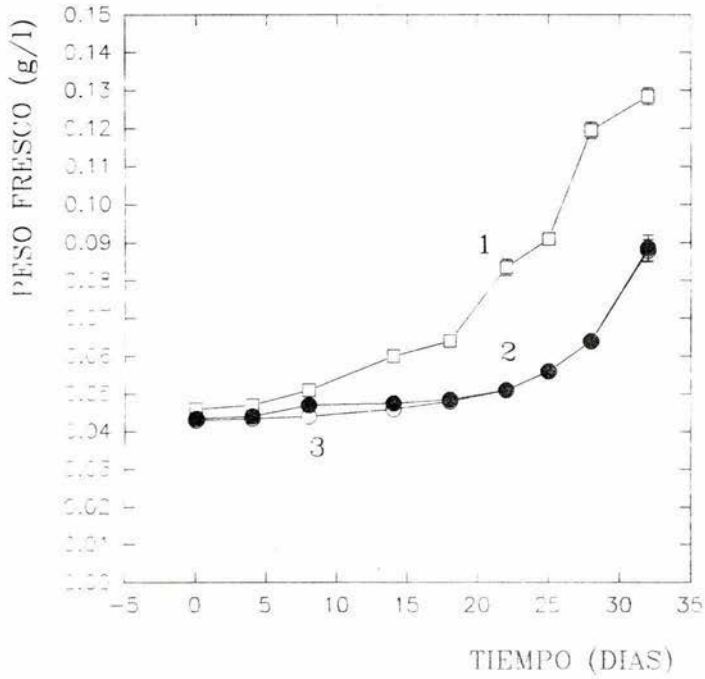


Fig. 3. Cinética de crecimiento celular para *Solanum tuberosum* L. var Alpha, en cultivo en suspensión para los medios 1, 2 y 3 (ver texto).

Los datos son promedios de 2 repeticiones \pm desviación estandar.

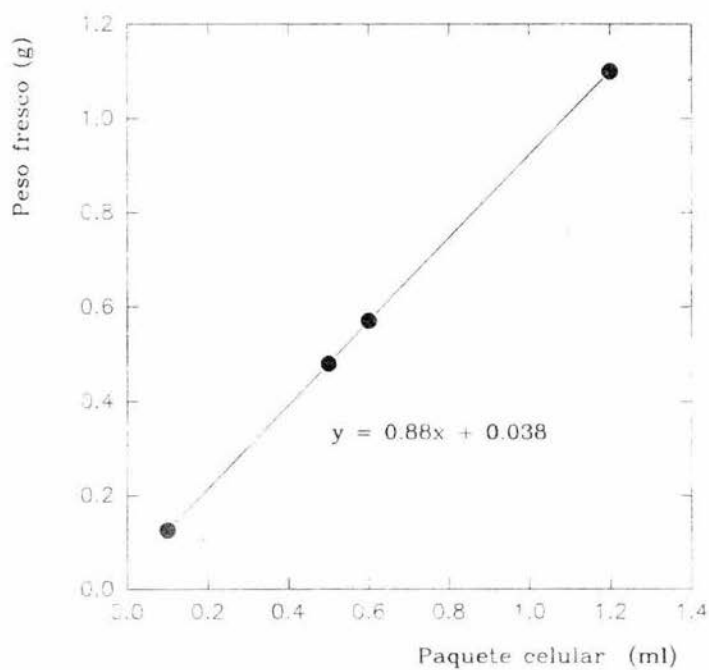


Fig. 3A.- Relación directa que existe entre el paquete celular obtenido por centrifugación y el peso fresco de las células en suspensión.

el rango de días de cultivo en que era adecuado hacer un trasplante.

Con todos los parámetros que se mencionan arriba, la elección del medio que deberíamos utilizar en la fase siguiente no resultó difícil. El medio 4 se descartó porque no es posible establecer cultivo en suspensión, en el medio 1, había pocas células meristemáticas y en el medio 3, la presencia de ácido giberélico parecía causar gran número de células deformes. Por eso nos decidimos por el medio 2, que tenía un rendimiento aceptable, la mayor proporción de células meristemáticas y presentaba suficiente grado de friabilidad (el cultivo en suspensión se establecía en dos días).

Desarrollo de embriogénesis somática.

Para esta fase de nuestro trabajo era primordial garantizar que las células utilizadas no llevaran restos del medio anterior. Con el método de centrifugado, tuvimos varios problemas, el primero fue que las células se dañaban, el segundo, que se contaminaban por tanto manejo. Optamos por fabricar pequeñas coladeras de malla de acero inoxidable de 200 mesh. Con esta técnica no tuvimos más problemas de contaminación y las células no se dañaban.

Después de permanecer 28 días en los medios de desarrollo de embriogénesis somática A, B, C y D (Ver tabla 2), no se encontraron embriones somáticos en ningún medio, ni se detectaron cambios en la morfología de las células. Un efecto observado en los cuatro medios - y por eso más bien adjudicable a un mayor tiempo en un cultivo líquido que a la nueva composición de reguladores de crecimiento, o a su ausencia, en el medio A - fue una mayor proporción de células

líbres que formaron en algunos casos pequeños callos, compuestos por un solo tipo celular. Un cuidadoso examen al microscopio no reveló ningún otro cambio morfológico ni en este tiempo de cultivo, ni transcurrido otro mes de tratamiento. El medio B, que empleaba la mitad de la concentración de reguladores usada en el medio de inducción de callo, aceleró la velocidad de crecimiento celular, de tal forma que transcurridas dos semanas de cultivo, las células ocupaban prácticamente todo el volumen del líquido y estaban muy oxidadas.

En papa no se ha reportado ninguna investigación de embriogénesis somática y en el diseño inicial de este trabajo, nos guiamos por los medios que han tenido efecto en otras plantas en la fase de desarrollo. Con los cuatro medios usados, cubrimos casi todas las opciones reportadas. En todo caso habría que probar con concentraciones más pequeñas de auxinas y citocininas. En algunos casos, en la fase de desarrollo de embriogénesis se utiliza una concentración menor de los reguladores empleados en la inducción de callo. Aunque la concentración suele reducirse a la mitad, era posible que las cantidades que estábamos usando estuvieran sobradas, porque en el medio B había crecimiento muy activo. El ABA se utiliza para realzar una tasa de desarrollo ya conocida y aunque tiene efecto positivo en algunas plantas, en la mayoría de los trabajos de desarrollo de embriogénesis somática, si se usan reguladores son auxinas y citocininas. Decidimos probar otros medios para desarrollo de embriogénesis, empleando solamente 2,4-D y cinetina, por lo antes

expuesto y porque simplificaba el diseño y nos ponía en posición de ir descartando elementos. Otra posibilidad que nos quedaba era variar los componentes no hormonales del medio nutritivo, pero preferimos hacerlo después de tener resultados con los reguladores.

El segundo experimento con medios de expresión de embriogénesis somática (Tab. 3) lo evaluamos después de cinco semanas de tratamiento. En ningún caso obtuvimos embriones, pero sí variación de la morfología celular. Para aprovechar esto e intentar ir sacando conclusiones que nos acercaran a la obtención de embriones somáticos, realizamos un inventario morfológico de las células presentes en todos los tratamientos manejados. Inventario que se describe en la Tab. 7. Las gráficas aparecen en la Fig. 4.

Los resultados de este experimento en relación con la caracterización celular pueden verse en la tabla 8. En todos los tratamientos, las células j son las más abundantes, era de esperar porque a nuestro parecer, los demás tipos celulares se diferencian a partir de ellas. Esto lo pensamos porque observamos que se dividen constantemente (Fig. 4). Le sigue en importancia el grupo e, células ovaladas que pueden llegar a alcanzar tallas increíblemente grandes. si hubiera sido posible cuantificar volumen ocupado por tipo celular ellas serían indiscutibles ganadoras. Apareció en los tratamiento V y VI, un tipo celular que no hablamos visto antes (g). Estas células presentaban todas las características que estábamos buscando: eran muy pequeñas, con núcleo y nucleolo muy grandes y teñidos y presentaban evidencias de una gran actividad metabólica (se veían corrientes

TIPO CELULAR	MORFOLOGIA
a	CELULAS DE SISTEMA CONDUCTOR, MUY LARGAS Y CON LOS EXTREMOS PLANOS.
b	CELULAS DE CUALQUIER ORIGEN CELULAR QUE PRESENTAN DEFORMACIONES EN FORMA DE EVAGINACIONES.
c	CELULAS COMPLETAMENTE CIRCULARES, CON NUCLEO PEQUEÑO Y CITOPLASMA MUY TRANSPARENTE Y VACUOLADO.
e	CELULAS OVALADAS, CON NUCLEO REDUCIDO Y GRAN CANTIDAD DE ORGANELOS VISIBLES.
f	CELULAS GRANDES Y MEDIANAS CON CITOPLASMA DENSO Y CON NUCLEOS PEQUEÑOS POCO TEÑIDOS.
g	CELULAS MUY PEQUEÑAS CON NUCLEO MUY GRANDE Y OSCURO, EL CITOPLASMA ES CLARO Y TIENE MUCHOS ORGANELOS VISIBLES.
h	CELULAS MEDIANAS CHICAS CON CITOPLASMA CLARO MUY VACUOLADO Y NUCLEO MUY VISIBLE DE FORMA VARIABLE.
i	CELULAS OVALADAS CON GRAN CANTIDAD DE INCLUSIONES CON ASPECTO DE CRISTALES DENTRO DEL CITOPLASMA.
j	CELULAS MEDIANAS O CHICAS CON CITOPLASMA MUY TRANSPARENTE, CON NUCLEO POCO VISIBLE O SIN NUCLEO.
l	CELULAS OVALADAS O REDONDAS CON EL CITOPLASMA DENSO Y CON MUCHOS ORGANELOS VISIBLES Y PARED ENGROSADA
m	CELULAS CHICAS QUE SE ENCUENTRAN AGRUPADAS FORMANDO CALLOS, CON CITOPLASMA DENSO Y OPACO.

TABLA 7.- CARACTERIZACION CELULAR EN BASE A LA MORFOLOGIA QUE PRESENTARON LAS CELULAS DE LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS PROBADOS. LAS FOTOGRAFIAS APARECEN EN LA FIGURA 4.

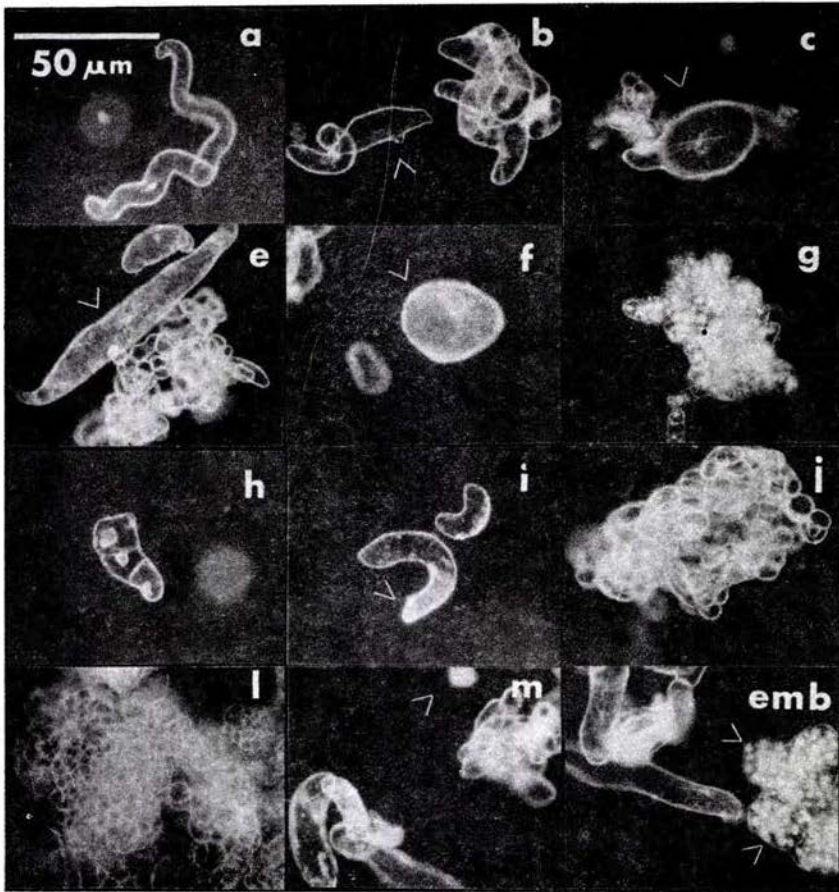


FIG. 4.- DISTINTOS TIPOS CELULARES PRESENTES EN TODOS LOS CULTIVOS EN SUSPENSIÓN PROBADOS PARA LA INDUCCIÓN Y DESARROLLO DE EMBRIONES SOMÁTICOS EN PAPA. LAS FOTOGRAFÍAS FUERON TOMADAS EN UN MICROSCOPIO DE CAMPO OSCURO A 100 AUMENTOS. LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS TIPOS CELULARES APARECEN EN LA TABLA 7.

TIPOS CELULARES (%)	T R A T A M I E N T O S					
	I	II	III	IV	V	VI
a	6	5	7	4	4	4
b	10	7	5	5	6	4
c	2	7	2	3	2	3
e	26	18	29	28	25	32
f	3	1	-	3	4	2
g	-	-	-	-	26	13
h	9	21	8	7	6	3
i	7	13	2	2	-	4
j	37	28	47	48	27	35
l	-	-	-	-	-	-
m	-	-	-	-	-	-

TABLA 8.- RESULTADOS OBTENIDOS EN EL SEGUNDO EXPERIMENTO PARA DE-
 SARROLLO DE EMBRIONES SOMATICOS DE PAPA. SE PUEDE APRECIAR EL EFECTO DE LOS DIS-
 TINTOS TRATAMIENTOS SOBRE EL PORCENTAJE DE TIPOS CELULARES PRESENTES EN EL CULTIVO
 DESPUES DE CINCO SEMANAS DE TRATAMIENTO.

citoplasmáticas y un gran número de organelos en movimiento). Lo cual nos hizo pensar que se trataba de células embriogénicas. Siempre se encontraron agrupadas, formando callos de un solo tipo celular, sin embargo no encontramos ninguna estructura que recordara un embrión. Las células g eran más abundantes en el tratamiento V.

Usando una mayor proporción de auxinas que de citocininas, no conseguimos cambios significativos en la morfología celular (medios I, II y III). Con una proporción mayor de citocininas 6:1 apareció la primera respuesta favorable (medios V y VI). Esto nos sorprendió porque suelen ser las auxinas, una mayor proporción de auxinas, o bien la ausencia de reguladores lo que desencadena el desarrollo de embriones; solamente en un artículo encontramos una respuesta similar (39).

Nos dimos a la tarea de probar con los elementos no hormonales del cultivo usando como constante la concentración de reguladores del medio V. En este experimento se mantuvo también invariable la concentración de nitrógeno reducido suministrado por dos fuentes: NH_4NO_3 y L-glutamina. Como ya se mencionó en la revisión bibliográfica, este nutriente aumenta la expresión de embriogénesis en numerosas especies (1, 11, 33, 38, 40, 41). A pesar de que el medio usado MB, tiene una concentración alta de nitrógeno reducido, agregamos más al medio porque también aumentamos la concentración de sacarosa y es muy importante mantener la relación C:N. Probamos con otro osmótico: la maltosa. Se midió el efecto de otros reguladores e incluso se disminuyó a la mitad la concentración de las sales

minerales. Intentamos así probar con todos los elementos que suelen tener efecto sobre los sistemas de desarrollo de embriones somáticos. Los resultados se detallan en la Tabla 9.

La presencia de concentraciones mayores de nitrógeno reducido y de sacarosa (R1), no alteran la abundancia de los tipos celulares presentes en el medio de cultivo, siguen siendo predominantes las células j y e, aunque hay una inversión de importancia -las células e son más frecuentes, no ocurrió lo que nos interesaba, la aparición de células embriogénicas. Suprimiendo los reguladores del cultivo (R2), tampoco ocasionamos que reaparecieran células embriogénicas, los grupos más importantes siguieron siendo el j y el e, pero apareció una nueva categoría celular, el l (Ver Fig. 4l). La disminución a la mitad de la concentración de sales minerales combinada o no con la ausencia de reguladores de crecimiento (R3 y R4), origina un nuevo tipo celular, el m (Fig. 4m). La presencia de maltosa, con o sin reguladores (R5 y R6) aumenta mucho la proporción en el cultivo de este último tipo celular. El efecto combinado de la disminución de sales minerales, mayor concentración de nitrógeno reducido y osmolaridad alta, alteran sustancialmente la morfología de las células, los tipos predominantes fueron el h y el m (Ver Fig 4h y 4m), grupos pequeños y densos, representaban juntos entre el 76 y el 93 por ciento del total. Este resultado sigue siendo el mismo aunque se cambien los reguladores empleados (R6 y R7).

En ningún caso aparecieron las células embriogénicas que se observaron en el experimento anterior, a pesar de que se utilizó la

TIPOS CELULARES (%)	T R A T A M I E N T O S						
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
a	4	5	5	3	2	-	-
b	19	9	4	7	6	2	1
c	3	3	5	2	1	-	3
e	34	30	22	19	27	3	2
f	8	7	4	8	4	2	2
g	-	-	-	-	-	-	-
h	11	9	8	-	4	48	25
i	-	3	-	-	-	-	-
j	21	34	44	31	36	-	16
l	-	-	-	-	-	-	-
m	-	-	8	30	20	45	51

TABLA 9.-. RESULTADOS DEL TERCER EXPERIMENTO PARA EL DESARROLLO DE EMBRIONES SOMATICOS DE PAPA. SE NOTA EL EFECTO DE LOS SIETE TRATAMIENTOS USADOS SOBRE EL PORCENTAJE DE CADA TIPO CELULAR PRESENTE EN LOS CULTIVOS. EL RESULTADO SE EVALUO DESPUES DE CINCO SEMANAS DE TRATAMIENTO.

misma concentración de reguladores del cultivo en que fueron más abundantes. Esto nos hizo pensar que el efecto observado en el medio V, se debía a otro factor que no estábamos considerando y que en aquel momento no pudimos precisar.

Los elementos no hormonales del medio no tuvieron por sí mismos efecto directo en la aparición, ni de células embriogénicas, ni de algún estado de desarrollo embrionario. Sin embargo pueden ser muy útiles en la homogeneización de los tipos celulares de un cultivo, paso limitante cuando se quieren hacer estudios bioquímicos o genéticos de un sistema embriogénico (17, 41, 50, 53), o cuando se utiliza a los embriones con fines prácticos (11, 38).

El único camino que nos quedaba era probar con concentraciones altas de reguladores. En relación con las hormonas era lo único que no habíamos probado y aunque resultara atípico, podía mostrarnos como reaccionaba el cultivo líquido de papa ante estos estímulos en relación con la embriogénesis u organogénesis en general. Como no teníamos ninguna idea de por donde empezar hicimos un diseño factorial donde se probaron las combinaciones posibles de cinetina 1, 2 y 3 mg/l y 2,4-D 1, 2, y 3 mg/l. No empleamos auxinas solas porque para la fase de expresión resultan inhibitorias. Los resultados de esta etapa aparecen en la Tabla 10.

Cuando las citocininas eran preponderantes en el medio, ya sea que se encontraran solas o que estuvieran en una proporción mucho mayor, originaban el desarrollo de células pequeñas y densas (m). Esto resultaba evidente tanto en este experimento (T2, T3), como en el

TIPOS CELULARES (x)	T R A T A M I E N T O S											
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
a	-	3	-	22	22	12	11	7	6	-	9	4
b	19	3	2	22	31	25	11	7	29	14	35	19
c	15	4	1	26	38	21	14	23	10	27	35	15
e	51	31	2	30	9	42	20	7	13	36	18	27
f	15	7	32	-	-	-	-	42	26	-	-	-
g	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
h	-	-	-	-	-	-	43	14	16	4	4	8
i	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
j	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18	-	27
l	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
m	-	52	63	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABLA 10.- RESULTADOS DEL CUARTO EXPERIMENTO PARA EL DESARROLLO DE EM-BRIONES SOMATICOS DE PAPA. SE MUESTRA EL EFECTO DE LOS MEDIOS UTILIZADOS SOBRE LA ABUNDANCIA DE LOS DISTINTOS TIPOS CELULARES EN LOS CULTIVOS LIQUIDOS.

exterior (R4, R5, R6 y R7). Estas células eran muy parecidas a las células de tubérculos. La tuberización in vitro requiere de citocininas y de altas concentraciones de sacarosa. Ambas condiciones se encontraban en los medios antes mencionados y por lo tanto la respuesta parecía lógica. En las combinaciones de reguladores restantes no se puede establecer ningún patrón. No había diferencias entre tratamientos cuando se usan concentraciones iguales de los dos reguladores o cuando se utilizaba el doble o el triple de alguno de ellos. Una explicación para este comportamiento podía ser que la respuesta en esta especie depende, de una preponderancia clara de alguno de los dos reguladores y todas las proporciones empleadas presentaban diferencias muy pequeñas.

Durante el tiempo de cultivo no aumentó la masa celular, las células permanecieron estables, pero no se reprodujeron. Ocurrió esto también en el experimento anterior, por eso creemos que fue un efecto provocado por los elementos no hormonales del medio nutritivo.

Hasta aquí algo teníamos claro, en el cultivo en suspensión que manejábamos como inóculo había células meristemáticas, porque el cultivo crecía activamente y porque de un tipo celular se estaban originando varios.

No parecían quedarnos muchas opciones. Estábamos pensando probar otras concentraciones de reguladores, altas pero con proporciones más amplias, cuando caímos en la cuenta de que había otro factor que podíamos manejar: el tiempo de exposición a los tratamientos.

Subcultivábamos células en suspensión a un medio fresco a las

cuatro o cinco semanas, porque en este tiempo las células alcanzaban la fase de crecimiento exponencial (Fig 3). En el medio para crecimiento celular, después de dos trasplantes, la fase lag desaparecía y era necesario hacer subcultivos quincenales con una proporción 1:5.

Para abastecer de células en suspensión los experimentos anteriores, estuvimos haciendo cultivos constantemente -en medio 2- . Tuvimos cuidado de que las células empleadas no hubieran sido subcultivadas en medio líquido más de dos veces. Los lotes usados se revisaban al microscopio antes de utilizarse como semilla, para garantizar que no estuvieran contaminados. Al hacer esto habíamos venido observando, con sorpresa, que en ocasiones los callos en cultivo eran diferentes, tenían una proporción mayor de callos con células pequeñas. Era sorprendente porque los lotes distintos tenían el mismo medio nutritivo, esterilizado al mismo tiempo; fueron inoculados con la misma pieza de callo, mantenidos el mismo tiempo, en idénticas condiciones ambientales y en el mismo agitador orbital que los otros. Además era la tercera vez que pasaba, de otra forma se hubiera pensado en contaminación del matraz. La única explicación que teníamos era que había ocurrido una especie de deriva de células y que el tipo celular predominante era resultado del azar.

La presencia de células embriogénicas en los tratamientos V y VI, podría explicarse si se hubiera ocupado como inóculo alguno de los lotes variantes. Buscamos en la bitácora y encontramos que así había sido.

Dejar la obtencion de embriones somáticos al azar no resultaba muy prometedor. Estuvimos buscando una diferencia y la encontramos: realmente lo único que podía haber variado en esos lotes, era la cantidad de inóculo (1-2 g/ matraz) y su grado de fraccionamiento (estos parámetros son muy difíciles de controlar). Esto estaba determinando gran cantidad de cosas. Si se inocula poco callo y apenas se disgrega, el cultivo en suspensión tarda mucho en establecerse, unas cuantas células se liberan; la competencia por los nutrientes es menor y se acumulan menos sustancias de desecho y proteínas secretadas por otras células, que en algunos casos tienen efecto inhibitor sobre el desarrollo de embriones somáticos (9,25); las células pueden permanecer más tiempo bajo la acción de los reguladores porque el medio no se satura en un mes, o quince días; y las células chocan menos, no forman masas con otras células y tienden a formar callos de un solo tipo celular.

Probamos esta hipótesis midiendo la abundancia de tipos celulares a las cuatro semanas de cultivo y después de de 10 semanas de tratamiento. Los resultados se observan en la Tabla 11 y en la Figura 5.

Cambió drásticamente la morfología celular cuando se aumentó el tiempo de tratamiento: las formas a, i y f desaparecieron; y los tipos celulares b, c y h se mantuvieron en niveles muy bajos. Con esto, las células grandes, antes predominantes, se eliminan para dejar en el medio sólo células meristemáticas j y l; y células g, embriogénicas (Ver Figs 4j,4l y 4g). Las células l pueden ser un

TIPOS CELULARES (%)	M E D I O 2	
	4 SEMANAS DE TRATAMIENTO	10 SEMANAS DE TRATAMIENTO
a	4	-
b	5	1
c	4	1
e	27	14
f	-	-
g	-	52
h	7	5
i	2	-
j	51	14
l	-	13
m	-	-

TABLA 11.- EFECTO DEL TIEMPO DE CULTIVO SOBRE LA ABUNDANCIA DE LOS DISTINTOS TIPOS CELULARES CUANDO SE UTILIZA EL MEDIO 2 PARA INDUCCION DE CALLO EMBRIOGENICO.

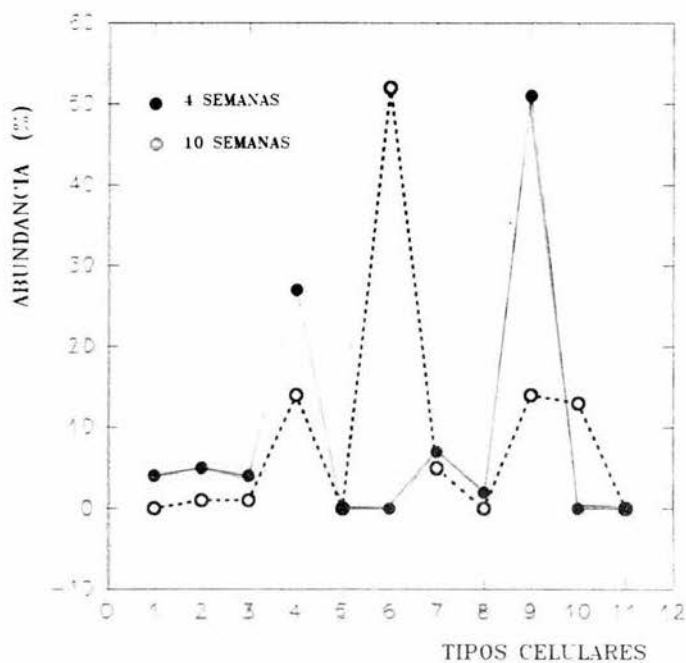


Fig. 5. Efecto del tiempo de cultivo sobre la abundancia de los tipos celulares en el medio 2 para inducción de callo. Tipos celulares 1-A, 2-B, 3-C, 4-E, 5-F, 6-G, 7-H, 8-I, 9-J, 10-L y 11-M.

estado intermedio entre las células j y las células embriogénicas por varias razones: sólo se encontraron en este caso, son metabólicamente muy activas y forman los grupos proembrionarios que tanto esperábamos (PEMs). Las formas embriogénicas eran las células predominantes en estos cultivos (52%). Estas células no se encontraban libres, formaban siempre diminutos callos, donde encontramos adheridos embriones en estado globular y algunos en estado de corazón (Ver Fig 6). De forma esporádica podría verse algún embrión libre en estado de corazón unido a un suspensor formado de varias células.

La embriogénesis temprana se divide en dos etapas: inducción y desarrollo de embriogénesis. En la primera, las auxinas parecen ser indispensables, mientras en la segunda resultan inhibitorias (1, 33, 38, 40). El punto en esta cuestión es en qué momento retirarlas.

Cuando establecimos el cultivo en suspensión el tejido tenía ya un mes y medio de tratamiento en medio semisólido. Las células permanecían en el matraz cuatro semanas más antes de ser trasladadas a algún medio de desarrollo. En las técnicas probadas con otras plantas, la etapa de inducción siempre estaba comprendida entre 4 y 8 semanas (3, 6, 7, 9, 12, 13, 18, 23, 24, 31, 34 y 36). Nuestras células permanecían mas de este tiempo en tratamiento, por eso no se nos había ocurrido pensar en aumentar el tiempo.

Las líneas celulares embriogénicas suelen evidenciarse por la presencia de PEMs (1, 38 y 40). En nuestros cultivos (medio 2), las células meristemáticas siempre formaban grupos de más de cuatro células, por eso pensábamos que eran grupos proembrionarios -el tamaño

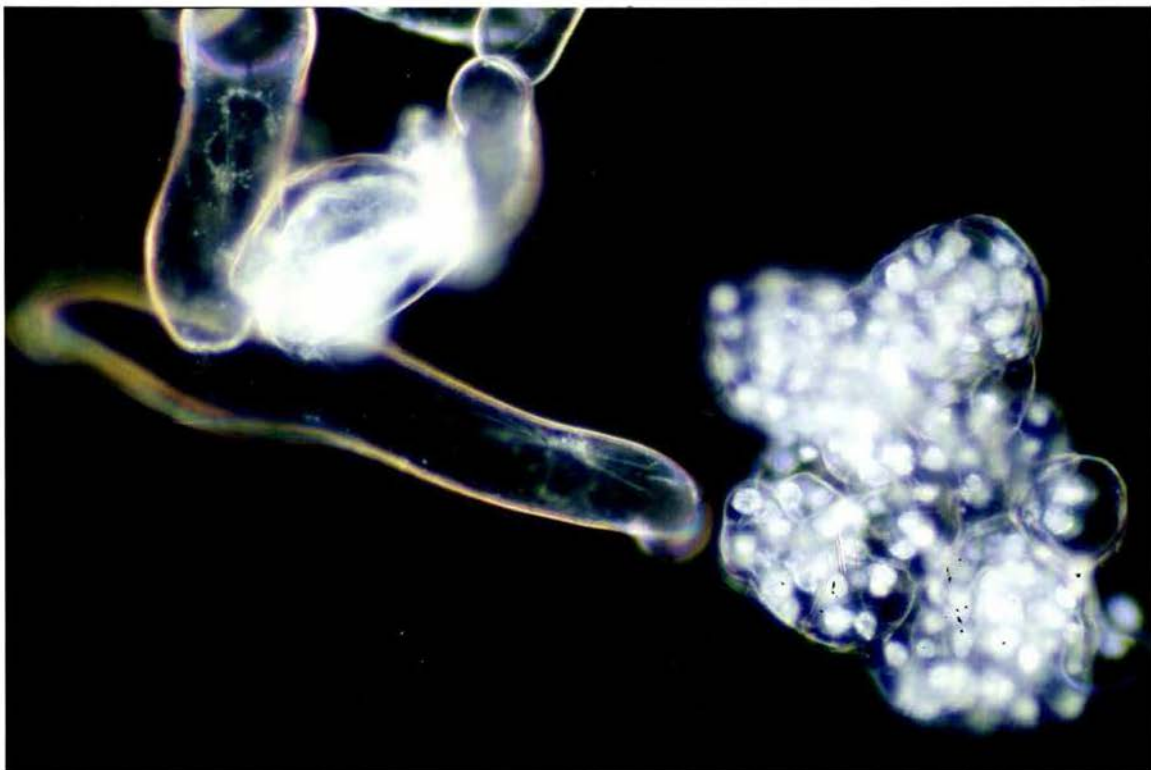


FIG. 6.- EMBRIONES SOMATICOS EN ESTADO DE
CORAZON. OBTENIDOS DESPUES DE 10 SEMANAS EN
CULTIVO EN SUSPENSION EN EL MEDIO 2.

crítico de un PEMs, parece estar entre 4 y 10 células-, pero no fue así. Esto lo supimos hasta que los observamos en el último cultivo. En los PEMs, las células proembrionarias se agrupaban de tal manera que formaban entidades independientes, perfectamente discernibles. Las células en suspensión de papa, requieren mayor tiempo para formarlos, 10 semanas en cultivo líquido.

El momento oportuno para eliminar las auxinas de nuestros cultivos no es, como lo reportan numerosos trabajos (7, 12, 18, 24 y 31) el de la emergencia de los PEMs, sino el estado globular o el de corazón. Los embriones encontrados detenían su desarrollo en esta fase invariablemente. Esto concuerda con los últimos trabajos sobre embriogénesis en plantas superiores (51), donde se reporta que las auxinas son requeridas para la transición desde el estado globular al de corazón, ellas son la señal que indica el sitio donde deben empezar a formarse los cotiledones. Los medios de expresión de embriogénesis somática para papa deben probarse a partir de embriones en estado globular o de corazón.

Una gran dificultad en esta investigación fue trabajar con métodos empíricos. Ciertamente que no teníamos otra opción, los marcadores moleculares -bioquímicos y genéticos- para embriogénesis en plantas apenas se están desarrollando (17, 50, 51, 52 y 53) y su generación está condicionada a contar con sistemas de embriogénesis somática muy bien conocidos (zanahoria, alfalfa, Aravidopsis). Estos marcadores seguro van a generar avances importantes sobre el conocimiento de la embriogénesis en plantas. Conocimiento que estamos

necesitando.

La estandarización de los medios de desarrollo de embriogénesis, utilizando como explantes embriones globulares, hubiera requerido más material celular y tiempo adicional, con los que no contábamos, por eso decidimos dejar la estandarización de esa etapa para trabajos futuros.

De cualquier forma, es mucho lo que se consiguió si se toma en cuenta que este es el primer trabajo sobre embriogénesis somática en esta especie. Indujimos el desarrollo de embriones somáticos en papa, estandarizamos un medio nutritivo para obtención de callo embriogénico en papa, establecimos un cultivo en suspensión de callo embriogénico, probamos el efecto de 2,4-D, cinetina y ácido abscísico sobre la expresión de embriogénesis somática en papa y determinamos los parámetros de cultivo necesarios para obtener embriones somáticos de papa en estado de corazón. El único objetivo que no se alcanzó fue la estandarización de un medio de cultivo para el desarrollo de embriones somáticos, pero creemos que los experimentos que hicimos con células en suspensión pueden servir como guía para trabajos posteriores.

CONCLUSIONES

- 1.- Puede formarse callo de papa con todas las concentraciones de reguladores de crecimiento probadas.
- 2.- En la papa, hay un rango muy amplio de respuesta a las proporciones de reguladores para la formación de callo.
- 3.- La presencia de las citocininas en el medio nutritivo para la formación de callo, resulta en el desarrollo de un callo muy diverso en tipos celulares.
- 4.- El ácido giberélico no tiene efecto sobre la producción de callo en papa.
- 5.- La combinación de reguladores que resulta en la formación de callo embriogénico es: 2,4-D 3 mg/l y cinetina 0.3 mg/l.
- 6.- El callo debe transplantarse a medio fresco antes de ser usado como inóculo para cultivo en suspensión,
- 7.- El cultivo en suspensión de callo embriogénico debe establecerse con 1-1.5 g de callo fraccionado por matraz.
- 8.- La mejor velocidad de agitación para los cultivos en suspensión fue de 120 rpm.
- 9.- Cuando se desea crecimiento celular, el tiempo de trasplante de las células en suspensión es de 4 semanas en el primer subcultivo y de 2 semanas en el segundo.
- 10.- En el cultivo de células en suspensión, cuando se disminuye a la mitad la concentración de reguladores empleados (2,4-D 1.5 mg/l y cinetina 0.15 mg/l) se acelera mucho el crecimiento celular.
- 11.- El ABA en la concentración probada, no tiene efecto en el

desarrollo de embriones somáticos a partir de cultivo en suspensión de papa.

12.- La presencia de una proporción alta de cinetina en el medio de cultivo, causa el desarrollo de células pequeñas y con citoplasma denso y opaco, en cultivo de células en suspensión de papa.

13.- Un medio muy osmótico, rico en nitrógeno reductor y pobre en sales minerales, puede eliminar la presencia en el cultivo en suspensión de células grandes y vacuoladas, pero disminuye la tasa de reproducción celular.

14.- Las concentraciones altas de 2,4-D y cinetina con proporciones 1:1, 1:2, 1:3, 2:3, 2:1, 3:1 y 3:2, no tienen efecto en el desarrollo de embriones somáticos de papa.

15.- El tiempo de subcultivo de un medio con células en suspensión para inducción de embriones somáticos en papa, debe ser de 10 semanas.

16.- Para el desarrollo de embriones somáticos de papa en estado cotiledonario es necesario utilizar como explantes para el medio de expresión, embriones en estado globular o de corazón.

17.- En este trabajo se estandarizaron las técnicas para obtención de embriones somáticos de papa, solamente hasta la primera fase de la embriogénesis somática temprana, la de inducción.

18.- Queda pendiente la estandarización de un medio de cultivo para el desarrollo de embriones somáticos en estado cotiledonario de papa.

CONSIDERACIONES FINALES

La obtención de embriones somáticos maduros de papa tendría un impacto muy favorable en los bancos de germoplasma de esta especie vegetal. Creemos que las investigaciones con este objetivo deben continuarse, por esto y porque la papa es una de las plantas más estudiadas y sería un excelente modelo para la investigación de la embriogénesis y los procesos de diferenciación celular que ésta involucra. Estudiar la formación de la semillas es estratégico porque en gran medida la alimentación humana tiene que ver con este proceso y porque el día que comprendamos cómo las células se diferencian abriremos una amplísima gama de posibilidades tecnológicas.

Para obtener embriones somáticos de papa útiles, sería necesario trabajar la embriogénesis temprana y la avanzada. En este estudio se consiguieron embriones somáticos hasta las primeras etapas de desarrollo, con lo cual se cubre solamente la primera fase de la embriogénesis temprana. Resultan indispensables embriones con cotiledones bien desarrollados para proseguir con estudios de maduración y germinación. La estandarización de un medio de desarrollo involucraría irremediamente un trabajo empírico pero los últimos descubrimientos sobre el papel de las auxinas en la embriogénesis resultarían de gran ayuda (ver discusión).

Aunque desarrollamos una técnica confiable para la obtención de embriones somáticos en etapas iniciales de desarrollo, no creemos que sea la óptima. Resultaría interesante probar en la etapa de inducción con un medio nutritivo libre de cinetina, atendiendo por supuesto a

las observaciones que hacemos en la discusión sobre la importancia del tiempo de cultivo y la concentración inicial del implante en el medio líquido.

Con base en nuestros resultados creemos que es muy probable que se encuentre una respuesta favorable en un medio de desarrollo libre de reguladores de crecimiento.

Una investigación sobre embriogénesis tardía de papa seguramente involucraría experimentos con ABA y algún agente osmótico como polietilenglicol; así como estudios sobre proteínas de reserva, agentes secantes y capacidad de germinación correlacionada con potencial hídrico.

Cualquier avance en el conocimiento fino (bioquímico y molecular) de la embriogénesis en este vegetal, esta subordinado a contar con un sistema de producción de embriones maduros confiable. Con cualquier planta que se pretenda utilizar como modelo, una buena parte de trabajo empírico es ineludible, porque siempre hay que estandarizar a condiciones particulares cualquier sistema. Un primer intento en este sentido vale la pena si se quieren respuestas.

Hay muchas interrogantes por abordar: el papel de las auxinas, la posible presencia de mensajeros secundarios, los receptores de éstas hormonas, las rutas metabólicas involucradas y el efecto de los componentes del medio de cultivo sobre ellas, los mensajeros extracelulares, los inhibidores, los genes involucrados, etétera.

La complejidad del problema es mucha, por eso sigue siendo uno de los grandes enigmas que tenemos que resolver.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Ammirato, P.V. (1984). Induccion, Maintenance, and Manipulation of Development in Embryogenic Cell Suspension Cultures. En: Cell Culture and Somatic Cell. Genetics of Plants, Vol 1. capítulo 17.(Indra K. Vasil,ed). Academic Press, Inc. Florida, EUA. 139-151 pp.
- 2.- Atanassov, A. y Brown, C.W. (1984). Plant regeneration from suspension culture and mesophyll protoplast of *Medicago sativa* L. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 3: 149-162.
- 3.- Attree, S. M., Pomeroy, M. K. y Fowke, L. C. (1992). Manipulations of conditions for the culture of somatic embryos of white spruce for improved triacylglycerol biosynthesis and dessication tolerance. *Planta*, 187:395-404.
- 4.- Bajaj, Y. (1987). Cryopreservation of Potato Germplasm. En *Biothecnology in Agriculture and Forestry*. Vol 3 Potato. Springer-Verlag. Berlin. 472-485 pp.
- 5.- Brisibe, E., Nishioka, D., Miyake, H., Taniguchi ,T. y Maeda, E. (1993). Developmental electron microscopy and histochemistry of somatic embryo differentiation in sugarcane. *Plant Science*, 89: 85-92.
- 6.- Bruijn, S. M., Ooms, J. J. y Vreugdenhil D. (1992). Influence of Abscisic Acid on storage of lipids and carbohidrates in developing *Arabidopsis* seeds. *Physiol Plant*, 85: A 91 § 515.
- 7.- Bueno, M. A., Astorga, R. y Manzanera, J. A. (1992). Plant regeneration though somatic embryogenesis in *Quercus suber* *Physiol Plant*, 85: 30-34.
- 8.- CIAMEC-CAEVAMEX, SARH INIA (1983). Marco de referencia del

cultivo de papa. 16 pp.

9.- Coutos-Thevenot, P., Maes, O., Jouenne, T., Mauro, M. C., Boulay, M., Deloire, A. y Guern, J. (1992). Extracellular protein patterns of grapevine cell suspensions in embryogenic and non-embryogenic situations. *Plant Science*, 86: 137-145.

10.- David, H., Domon, J-M., Savy, C., Miannay, N., Sulmon, G., Dargent R. y David, A. (1992). Evidence for early stage of somatic embryo development in a protoplast derived cell culture of *Prunus avium*. *Physiol Plant*, 85: 301- 307.

11.- Dixon, R. A. (1991). *Plant Cell Culture. The Practical Approach Series* Oirl Press. Oxford, England. 15- 20, 91- 96 pp.

12.- Etienne, H., Berger, A. y Carron, M. P. (1991). Water status of callus from *Hevea brasiliensis* during induction of somatic embryogenesis. *Physiol Plant*, 82: 213-218.

13.- Etienne, H., Sotta, B., Montoro, P., Miginiac, E. y Carron, M-P. (1993). Relations between exogenous growth regulators and endogenous indole-3-acetic acid and abscisic acid in the expression of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg). *Plant Science*, 88: 91-96.

14.- Finkelstein, R. R. y Crouch, M. L. (1986). Rapeseed embryo development in culture on high osmoticum is similar to that in seeds. *Plant Physiol*, 81: 907, 912.

15.- Galau, G. A., Jokobsen, K.S. y Hughes, D.W. (1991). The controls of late dicot embryogenesis and early germination. *Physiol Plant*, 81: 280-288.

- 16.- Gavish, H., Vardi, A. y Fluhr, R. (1992). Supression of somatic embryogenesis in Citrus cell cultures by extracellular proteins. *Planta*, 186: 511-517.
- 17.- Goldberg, R. B., Barker, S. J. y Perez-Grau, L.(1989). Regulation of Gene Expression During Plant Embryogenesis. *Cell*, 56: 149-160.
- 18.- Hakman, I. (1993) Embryology in Norway spruce (*Picea abies*). An Analysis of the composition of seed storage proteins and deposition of storage reserves during seed development and somatic embryogenesis. *Physiol Plant*, 87: 148-159.
- 19.- Harini, I. y Sita, L. (1993). Direct somatic embryogenesis and plant regeration from immature embryos of chilli (*Capsicum annum* L.). *Plant Science*, 89: 107-112.
- 20.- Hellergren, J. y Li, P. (1987) Freezer Preservation of Suspension Cultures of Potato. En *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol 3. Potato. Springer- Verlag, Berlin. 466-471 pp.
- 21.- Hess, J.R. y Garman, J. G. (1991). Oxygen Availability Effects Endogenous Hormone levels in Cultured Zygotic Embryos and Embryogenic Callus of Wheat. *Physiol Plant*, 82, B6 # 488.
- 22.- Hurtado, D. M. y Merino, M. E. (1988). *Cultivo de Tejidos Vegetales*. Trillas, México. 232 pp.
- 23.- Jha, T. B., Jha, S. y Sen, S. K. (1992). Somatic embryogenesis from immature cotyledons of an elite Darjeeling tea clone. *Plant Science*, 84: 209-213.
- 24.- Jia, S-R. y Chua N-H. (1992). Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryo culture of *Pharbitis nil* *Plant Science*, 87: 215-223.

- 25.- Kreuger, M. y Holst, G-J. (1993). Arabinogalactan proteins are essential in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Planta*, 189: 243-248.
- 26.- Linsmaier, E. M. y Skoog, F. (1965). Organic Growth Factor Requirements of Tabaco Tissue Cultures. *Physiol Plant*, 18: 100-127.
- 27.- Lozoya, H. S. (1985). Micropropagacion vegetal. Departamento de fitotecnica, Universidad Autonoma de Chapingo. 63-70 pp.
- 28.- Maldonado, U. (1982). Papa alimento base del pueblo mexicano. Universidad de Chapingo, México. 9 pp.
- 29.- Mathur, J. (1992). Plantlet regeneration from suspension cultures of *Valeriana wallichii* D.C. *Plant Science*, 81: 111-115.
- 30.- Minocha, S. C. (1991). Regulatory Role of Polyamines in Carrot Somatic Embryogenesis. *Physiol Plant*, 82: B4, # 21.
- 31.- Mo, L. H. y Arnold, S. (1991). Initiation, Proliferation and Maturation of Embryogenic Cultures of *Picea abies*. *Physiol Plant*, 82:B6, # 30.
- 32.- Mollers, C. Zitzlsperger, J. y Wenzel, G. (1992). The effects of a toxin preparation from *Phytophthora infestans* on potato protoplast and microspores. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 41: 427-435.
- 33.- Monnier, M. (1990). Induction of Embryogenesis in Callus Culture. En: *Methods in Molecular Biology*. (Pollard S. W. y J. M. Waller, eds). *Plant Cell and Tissue Culture*. Humane Press. New Jersey. 141-148 pp.
- 34.- Nissen, P. y Minocha, S. C. (1991). Inhibition by 2,4-D of somatic embryogenesis in carrot as explored by its reversal by DFMO.

Physiol Plant, 82-B6, # 31.

35.- Ortíz, G. M. (1986). Tuberización in vitro de papa (*Solanum tuberosum* L.). Tesis de Licenciatura, Biología, UNAM. México.

36.- Ortíz, G. M. (1993). Relaciones hídricas en embriones somáticos de alfalfa (*Medicago sativa* L.) y su asociación con acumulación de proteínas de reserva. ENEP Iztacala, UNAM, Mex. 6 pp.

37.- Palmer, C. E. y Smith, O. E. (1969). Cytokinins and Tuber Initiation in the Potato *Solanum tuberosum* L. *Nature*, 221:276-279.

38.- Payne, G., Bringi, U., Prince, C. y Shuler, M. (1991). *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems*. Hanser Publishers, New York. 51-56, 311-325 pp.

39.- Polgar, Z. y Krasnyanski, S. (1992). Plant regeneration from cell suspension and mesophyll protoplasts of *Helianthus maximiliani* (Schrad.). *Plant Science*, 87: 191-197.

40.- Raghavan, V. (1976). *Experimental Embryogenesis en Vascular Plants*. Academic Press, London. 351-381 pp.

41.- Raghavan, V. (1978). *Biochemistry of Somatic Embryogenesis*. En *Specialized Cell Culture Techniques*, 655-671 pp.

42.- Rajasekaran, K., Hein, M. B. y Vasil, I. K. (1987). Endogenous Abscisic Acid and Indole-3-acetic Acid and Somatic Embryogenesis in Culture Leaf Explants of *Pennisetum purpureum* Schum. *Plant Physiol*, 84: 47-51.

43.- Robert, M. (1985). El Potencial del Cultivo in Vitro de Células Vegetales en el Mejoramiento Genético de las Plantas. Departamento de Genética y Fisiología. Centro de Investigación Científica, Yucatán. 89-108 pp.

- 44.- Roberts, D. N. (1991). Abscisic acid and mannitol promote early development, maturation and storage protein accumulation in somatic embryos of interior spruce. *Physiol Plant*, 83: 247-254.
- 45.- Saxena, P. K., Malic, K. A. y Gill, R. (1992). Induction by thidiazuron of somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut. *Planta*, 187: 421-424.
- 46.- Schilde-Rentschler, L. y Roca, W. (1987). Tissue Culture for the International Exchange of Potato and Cassava Germplasm. En *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol 3. Potato. Springer-Verlag, Berlin. 453-465 pp.
- 47.- Schripsema, J., Meijer, A. H., Iren, F., Hoopen, H. J. G. y Verpoorte, R. (1990). Dissimilation curves as a simple method for characterization of growth of plant cell suspension cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 22: 55-64.
- 48.- Straub, P. F., Decker, D.M. y Gallagher, J.L. (1992). Characterization of Tissue Culture Initiation and Plant Regeneration in *Sporobolus virginicus* (Gramineae). *American Journal of Botany*, 79(10): 1119-1125.
- 49.- Thomas, T. L. (1993). Gene Expression during Plant Embryogenesis and Germination: An Overview. *Plant Cell*, 5: 1401-1410
- 50.- Tiainen, T. (1993). The influence of hormones on anther culture response of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Science*, 88: 83-90.
- 51.- West, M. A. L. y Harada, J. J. (1993). Embryogenesis in Higher Plants: An Overview. *Plant Cell*, 5: 1361-1369.

- 52.- Yeung, E. C. y Meinke, D. W. (1993). Embryogenesis in Angiosperms: Development of the Suspensor. *Plant Cell*, 5: 1371-1381.
- 53.- Zimmerman, J. L. (1993). Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants. *Plant Cell*, 5: 1411- 1423.

MEDIOS DE CULTIVO

REGULADORES DE CRECIMIENTO	
MEDIO 1	2,4-D 3 mg/l
MEDIO 2	2,4-D 3 mg/l, CINETINA 0.3 mg/l
MEDIO 3	2,4-D 3 mg/l, CINETINA 0.3 mg/l, GA ₃ 0.4 mg/l
MEDIO 4	2,4-D 3 mg/l, CINETINA 3 mg/l
MEDIO A	-----
MEDIO B	2,4-D 1.5 mg/l, CINETINA 0.15 mg/l
MEDIO C	----- ABA
MEDIO D	2,4-D 1.5 mg/l, CINETINA 0.15 mg/l, ABA
MEDIOS I-VI ¹	
MEDIOS R	2,4-D 0.08 mg/l, CINETINA 0.5 mg/l.
MEDIOS T ²	
CONSTITUYENTES ADICIONALES	
MEDIOS A, B, C, D: L-GLICINA	
MEDIOS R ³ : SACAROSA 6%, NH ₄ NO ₃ 400 mg/l, L-GLUTAMINA 750 mg/l	
MEDIOS T : SACAROSA 6%, MALTOSA 6%, NH ₄ NO ₃ 400 mg/L, L-GLUTAMINA 750 mg/l.	

¹ LAS CONCENTRACIONES DE REGULADORES UTILIZADOS EN CADA MEDIO APARECEN EN LA TABLA # 3.

² LAS CONCENTRACIONES DE REGULADORES DE LOS MEDIOS T, SE MUESTRAN EN LA TABLA # 5.

³ OTROS CONSTITUYENTES ADICIONALES DE LOS MEDIOS R, SE PUEDEN OBSERVAR EN LA TABLA # 4.

⁴ ESTA ES LA CONCENTRACION TOTAL DE SACAROSA EMPLEADA EN EL CULTIVO.

M E D I O B A S I C O ¹

MACRONUTRIENTES		MICRONUTRIENTES	
SALES	mg/l	SALES	mg/l
NH ₄ NO ₃	1650	H ₃ BO ₃	6.2
KNO ₃	1900	MnSO ₄ * 4H ₂ O..	22.3
CaCl ₂ * 2H ₂ O...	440	ZnSO ₄ * 4H ₂ O..	8.6
MgSO ₄ * 7H ₂ O...	370	KI.....	0.83
KH ₂ PO ₄	170	Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	0.25
Na ₂ EDTA.....	37.3 ²	CuSO ₄ * 5 H ₂ O.	0.025
FeSO ₄ * 7H ₂ O...	27.8 ²	CoCl ₂ * 6 H ₂ O.	0.025
CONSTITUYENTES ORGANICOS			
SACAROSA	20 g/l	L-GLICINA	1 mg/l
AGAR	7 g/l	TIAMINA * HCl	1 mg/l
MIOINOSITOL	100 mg/l	PIRIDOXINA * HCl.....	1 mg/l
		ACIDO NICOTINICO	1 mg/l

¹ pH AJUSTADO A 6.0 CON KOH Y HCl 1N.

² 5 ml/l DE UNA SOLUCION STOCK QUE CONTIENE 5.57 g FeSO₄* 7 H₂O Y 7.45 g de Na₂EDTA POR LITRO DE SOLUCION.

MEDICION DE CRECIMIENTO CELULAR EN CULTIVOS VEGETALES EN SUSPENSION

Se pueden obtener cultivos vegetales líquidos tanto de tejidos organizados (tallos y raíces), como de tejidos desorganizados. La cuantificación del crecimiento celular sólo puede efectuarse en estos últimos.

Como en todas las poblaciones en crecimiento, en los vegetales se presenta una curva con forma de campana invertida en la cual, pueden apreciarse seis etapas: fase lag, fase de aceleración, crecimiento exponencial, fase de desaceleración, fase estacionaria y fase de decremento. Para fines prácticos se concideran solamente tres, la etapa lag, la exponencial y la estacionaria.

Tanto para fines biotecnológicos como para investigación, es deseable mantener a las células en su fase metabólica más activa, la fase de crecimiento exponencial. Además, cuando el cultivo es transferido con frecuencia y las concentraciones del inóculo son suficientes, la fase lag puede ser muy corta o indistinguible. Por esto, la mayoría de los modelos matemáticos se circunscriben al periodo de crecimiento activo.

El cultivo de células en suspensión puede ser monitoreado por la medida de uno o más de los siguientes parámetros.

1) Volumen de paquete celular. Se centrifugan a la misma velocidad y por el mismo tiempo, muestras del cultivo a diferentes tiempos y se registran los volúmenes ocupados por el sedimento.

2) Número de células contadas con hematocitómetro.

3) Peso fresco o seco.

4) Contenido de proteínas y/o DNA.

5) Medición de conductividad.

Los métodos más utilizados por su simplicidad y rapidez, sobre todo en procesos industriales, son: la medición de paquete celular y el decaimiento de conductividad eléctrica.

Las tasas de crecimiento, así como las otras tasas metabólicas, generalmente dependen de las condiciones nutricionales que las células experimentan y de la influencia de los parámetros ambientales.

La apreciación de esta dinámica, está condicionada en ocasiones al método de medición de crecimiento elegido. Los cultivos de células en suspensión suelen experimentar periodos de división celular activa, en los cuales, el tamaño de las células permanece constante; alternados con etapas de elongación celular, donde el número de células es constante y aumentan las tallas celulares. Esta última fase puede ser llamada fase exponencial o estacionaria dependiendo de qué mide la técnica, número de células o masa celular. Para evitar problemas como este se prefieren las mediciones de masa celular.

El modelo matemático más utilizado para establecer cinéticas de crecimiento de células en cultivo es el modelo de Monott, que a continuación se anota.

$$rx = \mu x$$

$$\ln \frac{x}{x_0} = \mu(t-t_0)$$

$$td = \frac{\ln 2}{\mu} = 0.693$$

$$\text{Indice de crecimiento} = \frac{x}{x_0}$$

Donde:

rx = tasa de crecimiento.

μ = velocidad de crecimiento.

x = población final.

x_0 = población inicial.

td = tiempo de duplicación.