

252758 105

zej



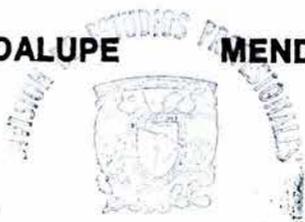
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

EL MEDIO CONDICIONADO EN CULTIVOS CELULARES DE MAIZ EN SUSPENSION. EFECTO EN EL CRECIMIENTO Y EN EL APARATO TRADUCTOR

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: BIOLOGA PRESENTA: GUADALUPE MENDEZ DEWAR



MEXICO, D. F.

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR



BIBLIOTECA INSTITUTO DE ECOLOGIA UNAM

1997

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



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.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

RECIBO DE ORIGEN
TESIS CON



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Medio condicionado en cultivos celulares de maíz en suspensión.
Efecto en el crecimiento y en el aparato traductor

realizado por Guadalupe Méndez Dewar

con número de cuenta 9052099-4 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Estela Sánchez Quintanar

Propietario

Dra. Sonia Vázquez Santana

Propietario

M. en C. Elda María Beltrán Peña

Suplente

M. en C. Guillermina Murguía Sánchez

Suplente

Biol. José Luis Busto Sanchez

Comité Departamental de Biología
M. en C. Mercedes Martínez Mena

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

A MIS PAPÁS

A mis amigos y hermanos.

El presente trabajo se realizó en el departamento de Bioquímica Vegetal de la Facultad de Química de la UNAM, gracias al apoyo de DGAPA en el proyecto IN-217496.

Agradezco la dirección de este trabajo a la Dra. Estela Sánchez de Jiménez y la valiosa asesoría de la Ing. Teresa Olivera y del M. en C. Raúl Aguilar.

Quiero agradecer al laboratorio de cultivo de tejidos, al equipo de la Dra. Sánchez y muy especialmente al equipo del laboratorio 114 por su incondicional apoyo en la realización de este trabajo.

Contenido

Abreviaturas	viii
Resumen	1
I INTRODUCCIÓN	
1. Planteamiento del Problema	2
2. Hipótesis de Trabajo	4
3. Objetivos	5
II ANTECEDENTES	
1. Maíz	7
1.1 Ubicación Taxonómica	8
2. Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV)	8
2.1 Tipos de CTV	9
2.2 Requerimientos nutricionales en CTV	12
2.2.1 Componentes inorgánicos	12
2.2.2 Componentes orgánicos	13
2.3 Fitorreguladores	14
2.3.1 Auxinas	15
2.3.2 Citocininas	17
2.4 Cultivo in vitro de maíz	19
3. Síntesis de proteínas (SP)	21
3.1 Ribosomas	21
3.2 Proteínas Ribosomales Ácidas (PRAs)	23
3.2.1 Fosforilación de PRAs	26
3.3 Traducción	27

3.3.1 Activación de aminoácidos	27
3.3.2 Iniciación	27
3.3.3 Elongación	29
3.3.4 Terminación	29
III DISEÑO EXPERIMENTAL	31
IV MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Material Biológico	35
1.1 Desinfestación de semillas de maíz	35
1.2 Obtención de embriones y siembra	36
2. Composición de los medios de cultivo	36
3. Cultivo <i>in vitro</i> de embriones maduros	37
3.1 Condiciones de siembra e incubación	37
3.2 Inducción de callo	37
3.3 Proliferación del callo	38
4. Establecimiento de cultivos en suspensión	38
4.1 Condiciones de siembra e incubación	38
4.2 Subcultivo de la suspensión celular	38
4.3 Tratamientos probados sobre la composición de los medio de cultivo	39
4.4 Establecimiento de cultivos celulares a partir de embriones inmaduros	40
4.5 Efecto del medio condicionado sobre los cultivos en suspensión obtenidos por callos de ebriones maduros	40
5. Evaluación de los cultivos celulares en suspensión	41

5.1 Evaluación por Paquete celular, peso fresco y seco	41
5.2 Evaluación de algunas características del aparato traductor	43
5.2.1 Obtención de las fracciones ribosomal y posribosomal	43
5.2.2 Rendimiento de ribosomas	44
5.2.3 Cuantificación de proteínas contenidas en la fracción posribosomal	44
5.2.4 Evaluación de la velocidad de síntesis de proteínas en los cultivos SEM, SEI y SMC	45
5.2.5 Isoelectroenfoque de las PRA's	45
5.2.5.1 Tinción de los geles para IEF	46

V RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Consideraciones	48
2. Efecto de dos concentraciones de citocinina sobre el crecimiento celular	50
3. Efecto de las citocininas BA y 2ip sobre el crecimiento celular	59
4. Efecto del medio condicionado sobre el crecimiento de los cultivos de maíz en suspensión	67
5. Efecto del medio condicionado sobre algunas características del aparato traductor	70
5.1 Rendimiento ribosomal	70
5.2 Contenido de proteínas en la fracción posribosomal	72
5.3 Velocidad de síntesis de proteínas	73

5.4 Isoelectroenfoque de las PRAs	75
VI CONCLUSIONES	80
VII LITERATURA CONSULTADA	81
VIII APÉNDICE	

Abreviaturas

BA	benzil-adenina
CEM	callos generados usando embriones maduros como explante
CEI	callos generados usando embriones inmaduros como explante
2ip	2-isopentil adenina
DNA	ácido desoxirribonucleico
IEF	Isoelectroenfoque
KIN-	Cinetina
MCPP	Ac. 2-(2-metil-4-clorofenoxi) propionico
PRA _s	Proteínas Ribosomales Ácidas
RNA	ácido ribonucleico
mRNA	RNA mensajero
rRNA	RNA ribosomal
tRNA	RNA de transferencia

RESUMEN

Uno de los objetivos de este trabajo fue encontrar las condiciones de cultivo *in vitro* para células de maíz en suspensión que ofrecieran un buen crecimiento a partir de callos generados de embriones maduros. Con esta finalidad se probaron diferentes variantes sobre la composición del medio de cultivo basal R2 (ver apéndice Tabla 1). En los tratamientos probados, las modificaciones se hicieron sobre la concentración de N⁶-furfuril-aminopurina (cinetina), se probaron otras citocininas conocidas como BA (N⁶-Benzil-Adenina) y Zip (2-isopentil adenina) y se usaron dos suplementos, uno de vitaminas (V-MS*) y otro de aminoácidos (Coctel 20). La respuesta de los cultivos a estas pruebas se evaluó a nivel de crecimiento, usando los parámetros de paquete celular (PC), peso fresco (PF) y peso seco (PS), gracias a los cuales fue posible elegir el tratamiento más productivo y reproducirlo tanto en células procedentes de embriones maduros (SEM) como de embriones inmaduros (SEI). Estos cultivos de células en suspensión, a su vez dieron lugar a un tercer cultivo, cuya población celular procede del cultivo SEM y el medio condicionado proviene del cultivo SEI. En estos cultivos celulares se evaluó el efecto del medio condicionado sobre el crecimiento usando los parámetros convencionales de PC, PF y PS. Se realizaron otras pruebas que proporcionaran cierta información a cerca de la condición de algunas características de la maquinaria de síntesis de proteínas. Dichas pruebas fueron las siguientes: rendimiento ribosomal, cuantificación de proteínas en la fracción posribosomal, evaluación de la velocidad de síntesis de proteínas ocurrida *in vivo* durante una activa división celular (fase exponencial) y la detección de las proteínas ribosomales ácidas presentes en los ribosomas de las células ubicadas en dicha fase mediante técnicas de electroforesis. Esta información permitió valorar el efecto de un medio condicionado sobre el crecimiento de un cultivo celular de bajo rendimiento así como sugerir posible explicación al lento crecimiento de los cultivos de células de maíz en suspensión (SEM), la cual puede estar relacionada con la eficiencia de la maquinaria de síntesis de proteínas.

I INTRODUCCIÓN

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las valiosas ventajas que ofrece la técnica de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, particularmente de células en suspensión, a la investigación básica han enfatizado la imperante necesidad de establecer un sistema de cultivo que genere un alto rendimiento celular en poco tiempo. En varias especies este sistema no ha logrado establecerse adecuadamente, el maíz es una de ellas y debido a su gran importancia económica ha sido sujeto de cada vez más investigaciones en este campo (Santos y Torné, 1986; Suprasanna *et al.* 1986).

El cultivo de células en suspensión ofrece una composición considerablemente homogénea en la población celular; bajo condiciones *in vitro*, el crecimiento está determinado principalmente por el genotipo y por el estado fisiológico del explante; las condiciones físicas y químicas del medio de cultivo son también un factor determinante en dicho proceso. En este sistema, los compuestos químicos del medio de cultivo son aprovechados simultáneamente por todas las células, por lo que se puede asumir que todas las células responden a las mismas condiciones (Darnell *et al.*,1990).

En maíz, el sistema de cultivos en suspensión se ha logrado principalmente usando callos procedentes de embriones inmaduros como explante, y menos satisfactoriamente usando embriones maduros. Sin embargo, la disponibilidad de los embriones inmaduros está restringida por la duración del ciclo agrícola, lo cual reduce la utilidad de este modelo (Wang, 1987). Se ha demostrado que algunos cultivos de bajo rendimiento pueden ser estimulados por la aplicación de medio de cultivo obtenidos de cultivos celulares con alto rendimiento celular, donde la presencia de células nodrizas es relativamente alta; el metabolismo de estas células modifica la composición del medio de cultivo generando lo que aquí llamamos medio condicionado (Bellincampi y Morpurgo, 1987).

El crecimiento y proliferación celulares están anteceditos por procesos de biosíntesis; la eficiencia en el mecanismo de síntesis de proteínas, se ve reflejada en el crecimiento de los cultivos celulares, por lo que el análisis de estos parámetros podría servir para entender el comportamiento de los cultivos celulares en crecimiento.

El implemento de una técnica que optimice el rendimiento celular de los cultivos en suspensión obtenidos a partir de embriones maduros de maíz (SEM), ofrece una alternativa para la obtención de un sistema biológico manipulable que pueda ser el material para diversos tipos de investigación.

En este trabajo se propone el uso del medio condicionado extraído de los cultivos celulares obtenidos por embriones inmaduros de maíz, como un suplemento que puede optimizar el crecimiento de los cultivos SEM. Así mismo, se describe el efecto de la aplicación de este medio condicionado, sobre el crecimiento y sobre algunas características de la maquinaria de síntesis de proteínas.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Si los metabolitos producidos por las células nodrizas se encuentran libres en el medio de cultivo de una suspensión celular de rápido crecimiento, como los obtenidos con embriones inmaduros (SEI), entonces la aplicación de éste medio condicionado podría estimular la división celular en un cultivo de bajo crecimiento, como lo es el cultivo en suspensión obtenido de embriones maduros de maíz (SEM).

Por otra parte, si las PRAs están involucradas directamente en el mecanismo de biosíntesis de proteínas, el cual es un proceso esencial durante el crecimiento y la división celular, podría haber una relación entre el contenido de las primeras en los ribosomas y el crecimiento de la población celular de cultivos en suspensión obtenidos por embriones maduros e inmaduros de maíz de tal manera que:

- a) Los cultivos en suspensión logrados bajo condiciones *in vitro* que muestren un buen crecimiento (a partir de embriones inmaduros), contendrán una mayor cantidad de PRAs asociadas a sus ribosomas que los cultivos con crecimiento relativamente bajo (a partir de embriones maduros de maíz).
- b) La aplicación del medio condicionado obtenido a partir de SEI a los cultivos SEM inducirá un incremento en la velocidad de crecimiento de estos cultivos y en la cantidad de PRAs asociadas a los ribosomas de éstas células.

3. OBJETIVOS

Objetivo general

Encontrar las condiciones de cultivo *in vitro* que permitan establecer cultivos celulares en suspensión, obtenidos a partir de embriones maduros (cultivos SEM), e inmaduros de maíz (cultivos SEI) de la raza Tuxpeño, y evaluar el efecto del medio condicionado en el crecimiento de cultivos SEM así como en la eficiencia de la maquinaria de síntesis de proteínas y su relación con la presencia de proteínas ribosomales ácidas.

Objetivos particulares

1. Determinar la composición de un medio de cultivo que favorezca el crecimiento de los cultivos celulares en suspensión de maíz a partir de embriones maduros.
2. Evaluar el efecto de un medio condicionado (procedente de los cultivos SEI), sobre el crecimiento los cultivos SEM.
3. Evaluar el efecto del medio condicionado sobre algunas características de la maquinaria de síntesis de proteínas mediante la evaluación del rendimiento ribosomal, del contenido de proteínas en la fracción posribosomal y de velocidad de síntesis *in vivo* de proteínas para los cultivos SEM, SEI y SMC.
4. Encontrar la relación que pueda existir entre el crecimiento de los cultivos con la presencia de las PRAs en los ribosomas y el efecto del medio condicionado con la velocidad de síntesis de proteínas.

Metas

1. Establecer cultivos de células en suspensión de células de maíz provenientes de callos generados a partir de embriones maduros (SEM).
2. Establecer cultivos en suspensión de células generadas por callos de embriones inmaduros (SEI) y de embriones maduros con medio condicionado (SMC), incubadas en las condiciones elegidas para las procedentes de embriones maduros.
3. Determinar y depurar las técnicas de evaluación de crecimiento celular y respecto a la maquinaria de síntesis de proteínas.

II ANTECEDENTES

1 MAÍZ

El maíz (*Zea mays* L.) se encuentra entre los cuatro cultivos más importantes del mundo. La importancia del maíz es legendaria, el centro de origen y dispersión más probable es el continente americano, donde los indígenas domesticaron e iniciaron la selección del maíz contribuyendo relevantemente a la formación de razas y variedades que se han conservado a través del tiempo por los agricultores y han sido estudiadas y clasificadas por los científicos para su conservación, mejoramiento y mantenimiento. Una de las razas de maíz más explotadas comercialmente es la raza "Tuxpeño", la cual es el resultado de la hibridación entre las razas Olotillo y Tepecintle, clasificadas dentro de las mestizas prehistóricas. Las variedades de Tuxpeño se cultivan en las tierras bajas del Golfo de México (Reyes-Castañeda, 1990).

El maíz es una planta monóica de cultivo anual y con un período vegetativo muy corto. Después de la fecundación, cada ovario se transforma en un fruto (cariópside), que lleva en su interior una sola semilla. La estructura de la semilla de maíz está conformada por la testa, el endospermo y el embrión. El embrión está formado por el escutelo (el cual corresponde al cotiledón), y por el eje embrionario, (Ver lámina 1), el primero es la conexión entre el endospermo y el eje embrionario, además de ser el encargado de absorber los productos hidrolizados en el endospermo y transportarlos hacia el eje embrionario en crecimiento. El eje embrionario está constituido por el hipocótilo, el cual está cubierto por el coleoptilo; ésta estructura da origen a la hoja embrionaria, a la radícula y a la coleorriza (Esau, 1977).

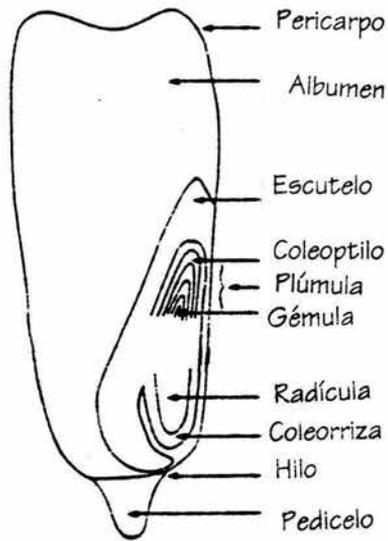


Lámina 1. Corte longitudinal de una semilla de maíz completa.

1.1 Ubicación taxonómica

Reino	<i>Plantae</i>
Phylum	<i>Tracheophyta</i>
Subphylum	<i>Pterapsidae</i>
Clase	<i>Angiosperma</i>
Subclase	<i>Monocotiledóneae</i>
Orden	<i>Graminales</i>
Familia	<i>Gramineae</i>
Tribu	<i>Maydeae</i>
Género	<i>Zea</i>
Especie	<i>Zea mays L.</i>

Tomado de Reyes- Castañeda, (1990)

2 CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES (CTV)

El cultivo de células vegetales se basa en el principio de totipotencia celular, el cual establece que toda célula somática vegetal contiene el potencial genético y fisiológico necesarios para generar un organismo completo (Thorpe, 1978).

La técnica de CTV consiste en el establecimiento *in vitro* de cualquier tejido vegetal bajo condiciones asépticas y ambientales controladas, en medios nutritivos adecuados (Berlin, 1986).

El uso de cultivos de células, tejidos y protoplastos vegetales ha adquirido cada vez mayor importancia en áreas de investigación tanto básica, como aplicada. Estos

sistemas representan un suministro continuo y homogéneo de material vegetal en un estadio fisiológico uniforme para la investigación a nivel fisiológico y bioquímico, por lo cual, estos sistemas contribuyen al conocimiento de los procesos metabólicos y de síntesis de muchas biomoléculas (Thorpe, 1978; Torres, 1988; Pollard y Walker, 1990).

El estudio de los procesos morfogénéticos y de diferenciación celular se ha apoyado considerablemente en la técnica de CTV (Langezaal y Scheffer, 1992). Mientras que la obtención de plantas libres de virus (Vasil, 1987), la conservación de germoplasma (Tomes, 1985) y la obtención de metabolitos secundarios (Fujita y Tabata, 1987), son otras de las múltiples aplicaciones de esta técnica.

2.1 Tipos de Cultivos de Tejidos Vegetales

Existen varios tipos de CTV, y de acuerdo con la clasificación propuesta por Thorpe en 1978 estos son: 1) Cultivo de callos, 2) Cultivo de células en suspensión, 3) Cultivo de órganos, 4) Cultivo de meristemas, 5) Cultivo de protoplastos, y 6) Cultivo de embriones. A continuación se describen los dos primeros dada su importancia en el presente trabajo.

1) Cultivo de callos. Es obtenido por medio del aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, los cuales son llevados a una dediferenciación celular, mediante la aplicación exógena de fitorreguladores del tipo de las auxinas y citocininas (Brown, 1990). Estos cultivos se caracterizan por presentar un crecimiento acelerado y una apariencia desorganizada, los cuales dan como resultado a una masa amorfa de tejido conocida como callo (Thorpe, 1978; Brown 1990).

En maíz se presentan tres tipos diferentes de callo. El primero es el callo Tipo I, el cual es compacto, organizado y de lento crecimiento; el callo Tipo II, es suave, friable y de rápido crecimiento. El tercero es el callo rizogénico en el que las células tienden a diferenciarse en raíces o estructuras similares (root-like structures). El callo tipo II es ideal para el establecimiento de cultivos de células en suspensión (Vain *et al.*, 1989).

En las plantas regeneradas a partir de cultivo de callos, eventualmente se han encontrado variaciones somaclonales y genéticas, tales como alteraciones que afectan el número y la estructura de los cromosomas (Orton, 1984). Wang sugiere que las plantas regeneradas a partir de embriones maduros de maíz son genéticamente más estables que aquellas que derivan de embriones inmaduros (Wang, 1987).

2) Cultivo de células en suspensión. Estos cultivos son obtenidos al inocular callos de tipo II en un determinado volumen de medio de cultivo líquido y mantenidos en agitación constante. Están caracterizados por la homogeneidad morfológica y bioquímica de sus componentes celulares (Torres, 1988; Darnell *et al.*, 1990). Durante la incubación, la cantidad de células aumenta hasta alcanzar un punto máximo, determinado como rendimiento del material celular. Si el cultivo es diluido (subcultivado) en este punto, se repite el mismo patrón de crecimiento. Cuando el crecimiento celular se evalúa a través del tiempo de incubación, se obtiene una curva de crecimiento, en la cual se distinguen cuatro fases: reposo, exponencial, estacionaria y de decaimiento. La fase de reposo, es la respuesta inicial de las células a las condiciones de cultivo y no se detecta división celular, esta última, ocurre cuando el inóculo se ha adecuado a dichas condiciones preparándose así a la división celular. El proceso de división celular se lleva a cabo en lo que se conoce como fase exponencial dentro la curva de crecimiento celular y su duración está limitada por los componentes del medio de cultivo, los cuales han sido consumidos por el propio metabolismo celular. Cuando alguno o varios nutrientes dejan de estar disponibles en el medio, la división celular cesa y se inicia el alargamiento celular,

dando lugar a la fase estacionaria, en la que se registra la máxima densidad del cultivo y está sucedida por la fase de decaimiento caracterizada por muerte celular (Dodds y Roberts, 1982). El período entre la iniciación del cultivo y la fase estacionaria, está determinado principalmente por la densidad inicial del cultivo, la duración de la fase de reposo y la velocidad de crecimiento de la línea celular. Las densidades iniciales bajas, prolongan la fase de reposo y la duración de la fase exponencial (no su rendimiento), esto se puede explicar por la ausencia o escasa presencia de las células llamadas "nodrizas". Se les llama células nodrizas a las células en división, durante éste proceso se liberan al medio ciertos metabolitos que favorecen la división celular (Torres, 1988). A pesar de las investigaciones realizadas en torno al factor condicionado, su naturaleza y composición siguen sin conocerse (Bellincampi y Morpurgo, 1987). Se ha propuesto que estos metabolitos pueden ser aminoácidos (Pollard y Walker, 1990). Sin embargo éste factor condicionante no puede ser substituido por ningún fitorregulador (Bellincampi y Morpurgo, 1987). De alguna manera, las células nodrizas acondicionan el medio y estimulan el crecimiento del cultivo. La adición de este medio condicionado a cultivos de baja densidad incrementan su rendimiento (Moore, 1989). Se ha demostrado que las suspensiones celulares diluidas se pueden dividir en un medio condicionado donde otras células han crecido previamente (Bellincampi y Morpurgo, 1987).

El cultivo de células en suspensión es un modelo que ofrece suficientes ventajas a la investigación y es motivo de diferentes estudios. Trabajos previos, han demostrado que ocurren cambios en los procesos fisiológicos de los cultivos en suspensión de rápido crecimiento, tales como el metabolismo de ácidos orgánicos, la síntesis de aminoácidos, la respiración y la síntesis de proteínas. En pruebas realizadas con cultivo *in vitro* de rosa, se ha encontrado un decaimiento en el volumen ocupado por algunos componentes celulares como el retículo endoplásmico (ER) y los plastidios. Si consideramos que el ER está asociado con la formación de polipéptidos y que los plastidios son el lugar de síntesis de muchos aminoácidos se puede reconocer la importancia de dichos componentes en la síntesis de proteínas. Bajo condiciones *in vitro*, se ha observado

primero, un decaimiento en la síntesis de proteínas seguido de un decaimiento en el volumen ocupado por ER y plastidios (Bonnie *et al.*, 1992).

2.2 Requerimientos nutricionales en los Cultivos de Tejidos Vegetales

Los avances en la técnica de CTV están estrechamente correlacionados con los progresos en la investigación sobre los requerimientos nutricionales de las células. El medio nutritivo utilizado en CTV debe proveer a las células de iones inorgánicos, una fuente de carbono (usualmente sacarosa); la aplicación de ciertos componentes como vitaminas, aminoácidos y reguladores de crecimiento. Los componentes del medio de cultivo para callos y células en suspensión se pueden integrar en dos grandes grupos: componentes orgánicos y componentes inorgánicos (Hurtado y Merino 1987).

2.2.1 Componentes inorgánicos

Macronutrientes: indispensables para el crecimiento de la mayoría de los cultivos celulares, dichos nutrientes son requeridos en cantidades relativamente grandes (sales de nitrógeno, potasio, calcio, magnesio y azufre).

Micronutrientes: son esenciales aunque en cantidades menores para el crecimiento de las células (sales de hierro, manganeso, zinc, boro y cobalto).

2.2.2 Componentes orgánicos

Se encuentran en la composición de la mayoría de los medios de cultivo y podemos clasificarlos en tres grupos: a) carbohidratos, b) vitaminas, c) ciertos compuestos nitrogenados (Hurtado y Merino, 1987).

a) **Carbohidratos.** La mayoría de los CTV son heterótrofos, dada la incompetencia fotosintética de los tejidos, por lo que se hace necesario suplementarlos con una fuente de carbono (George y Serrington, 1984; Brown, 1990). La sacarosa y la glucosa inducen un mayor crecimiento de los cultivos, aunque eventualmente se utiliza la fructosa como fuente de carbono (Fowler *et al.*, 1982). Los niveles de carbohidratos requeridos por los cultivos de tejidos vegetales están relacionados con los procesos morfogénicos (Bonga y Von Anderkas, 1991).

b) **Vitaminas.** Las vitaminas son sustancias requeridas por las células para cumplir o llevar a cabo ciertas reacciones catalíticas esenciales en el metabolismo, ya que actúan como cofactores de la mayoría de las enzimas. La combinación de vitaminas propuesta por Murashige y Skoog ha sido amplia y exitosamente usada en CTV (George y Serrington, 1984).

c) **Compuestos Nitrogenados.** Estos compuestos proveen a las células vegetales de una fuente inmediata de nitrógeno (N), que es utilizada más rápidamente que el N inorgánico; una fuente de nitrógeno reducido estimula la división de protoplastos y de células en cultivo. Diversos trabajos han señalado la importancia de la aplicación de aminoácidos para el crecimiento y la morfogénesis *in vitro* de los cultivos vegetales (George y Serrington, 1984).

2.3 Fitorreguladores en Cultivo de Tejidos Vegetales

El control del crecimiento vegetal está regulado por las hormonas vegetales (fitorreguladores), los cuales pueden definirse como aquellas sustancias orgánicas que son activas en concentraciones mínimas (del orden de 10^{-6} M o menos), que se sintetizan en una parte específica de la planta, y que generalmente se translocan a otro sitio, en donde producen las respuestas bioquímicas relativas al crecimiento y diferenciación de los tejidos y órganos con los cuales se ponen en contacto (Moore, 1989).

Se conocen cinco tipos de fitorreguladores que controlan el crecimiento y desarrollo de las plantas, los cuales han sido clasificados por su naturaleza química y por los efectos fisiológicos en los que están involucrados. Estos fitorreguladores son los siguientes: giberelinas, citocininas, etileno, ácido abscísico y auxinas (Bewley y Black, 1994). Entre estos, las auxinas y las citocininas son ampliamente utilizados en la técnica de CTV.

La naturaleza del desarrollo vegetal requiere que las plantas regulen continuamente la división y el alargamiento celular, en respuesta a señales genéticas, así como a una amplia variedad de factores ambientales. Muchos estudios fisiológicos han demostrado que los fitorreguladores del tipo de las auxinas y las citocininas, tienen funciones fundamentales en la regulación del crecimiento vegetal. Ambos compuestos son aparentemente esenciales para el crecimiento de células en cultivo. La organogénesis en cultivo de tejidos es modificada por los cambios entre las concentraciones de auxina y citocinina (Hobbie *et al.*, 1994). La rizogénesis y la embriogénesis son procesos de diferenciación celular que se promueven al incrementar las concentraciones de auxinas con respecto a las citocininas; en cambio al invertir estas concentraciones y aumentar la de citocininas con respecto a la de auxinas se induce al tejido vegetal a la formación de brotes adventicios. El estado de dediferenciación celular depende del balance entre las concentraciones de estos fitorreguladores (Fakhrai y Fakhrai, 1990). Experimentos

realizados con aplicaciones exógenas de auxinas y citocininas, han demostrado que cada uno de estos fitorreguladores puede modificar dramáticamente el crecimiento y desarrollo de la planta, y que estos tienen funciones antagónicas (Li *et al.*, 1991). A pesar de su importancia, aún se sabe muy poco acerca de los mecanismos de acción de estos fitorreguladores a nivel molecular (Hobbie *et al.*, 1994).

2.3.1 Auxinas

Las auxinas están involucradas en diferentes aspectos en el crecimiento y desarrollo de una planta, en los que están incluidos el fototropismo, el gravitropismo, el alargamiento, la diferenciación vascular, así como en la formación de ramificaciones laterales en tallos y raíces (Droog *et al.*, 1993; Abel *et al.*, 1994).

En los tejidos tratados con auxinas se estimula la síntesis de DNA, RNA y de proteínas, lo que permite la proliferación celular (Thorpe, 1978). En general, todos los cultivos celulares necesitan un suministro exógeno de auxina para un continuo crecimiento indiferenciado (Everett *et al.*, 1981).

El ácido indolacético (AIA) es la principal auxina natural en plantas superiores. Sin embargo hay muchos compuestos sintéticos que pueden llamarse auxinas, ya que su acción fisiológica es similar a la del AIA (Moore, 1989). En la planta, las auxinas se encuentran en mayor concentración en los tejidos meristemáticos y esta concentración disminuye al alejarse de éstos (Devlin *et al.*, 1987).

Los efectos de las auxinas se dividen en dos categorías en función del tiempo de respuesta: las que ocurren rápidamente después de la exposición a la auxina, como la deformación y el alargamiento de la pared celular y las respuestas de largo plazo como la división y la diferenciación celulares (Jacobs y Ray, 1976).

Uno de los efectos de las auxinas mejor estudiados es el rápido alargamiento en secciones de tallo, hipocótilo y coleótilo. De acuerdo a la hipótesis de crecimiento ácido propuesta por Raylen, Hager y Cleland en 1976 (citada en Cleland y Rayle, 1978), el alargamiento celular en secciones de tallo, es debido a la acidificación de la pared celular inducida por las auxinas, las cuales inducen alguna manera, la pérdida de la pared celular permitiendo la expansión celular debido a la turgencia (Cleland y Rayle, 1978). Se ha postulado que posiblemente la acción de una ATPasa localizada en la membrana, actúa como una bomba de protones, causando la acidificación de la pared celular. El incremento de H^+ debilita los enlaces no covalentes entre los polímeros de xiloglucanos y las microfibrillas de celulosa de la pared celular (Cleland, 1976). De esta manera, las auxinas promueven la excreción de protones en la célula reduciendo el pH de la matriz de la pared provocando la pérdida de la pared celular (Cleland y Rayle, 1978). Por esto, puede decirse que los iones hidrógeno actúan como segundos mensajeros de las auxinas (Cleland, 1988; Yi et al., 1996).

Esta hipótesis tiene algunas deficiencias, ya que la síntesis de RNA y de proteínas inducidas por auxinas es casi inmediata a su adición, mientras que las enzimas involucradas en la degradación y síntesis de la pared celular tiene un período de retraso en su aparición (Baulcombe y Key, 1980). Por otra parte se han encontrado que otras sustancias, como la fucosina o la simple acidificación del medio que pueden producir el efecto de elongación del tejido blanco, al menos por un tiempo (Jacobs y Ray, 1976).

A nivel molecular, el papel de las auxinas aún no es claro; se ha reportado que estimulan la síntesis de rRNA (Guillfoyle, 1980), así como de mRNA para proteínas ribosomales (Gantt y Key, 1985). También se ha observado que alteran el patrón de las proteínas sintetizadas en los tejidos estimulados con este tipo de fitoreguladores. Además, la acción de las auxinas ha sido asociada con los cambios en el estado de fosforilación de proteínas celulares (Pérez et al, 1990).

Se han reportado numerosos ejemplos de cambios en la actividad de los canales iónicos debido a la presencia de auxinas (Marten *et al.*, 1991). Cambios en el pH citoplásmico han sido detectados en respuesta a la aplicación exógena de auxinas; diferentes trabajos señalan que el efecto de acidificación citoplásmica puede ser invertido produciendo una alcalinización al incrementar la concentración de auxinas minutos después de ser aplicadas (Gehling *et al.*, 1990). En cuanto al papel que presentan en la fosforilación de proteínas, se ha demostrado en *Arabidopsis*, que la auxina activa a la cinasa que fosforila a la MAP cinasa, la cual regula varios sustratos incluyendo a aquellos que participan en la división celular (Jonak *et al.*, 1994). Por otra parte, se sabe que las auxinas regulan muchos de los genes involucrados en la división y diferenciación celular, las auxinas inducen cambios en la actividad de ciertos genes, los cuales podrían ser parte de una ruta general de control de crecimiento y metabolismo; dichos genes son generalmente inducidos en un período de horas después de la adición de las auxinas (Hobbie *et al.*, 1994; Napier y Venis, 1995).

2.3.2 Citocininas

Las citocininas fueron identificadas por primera vez por Skoog y Miller como un factor esencial para la división celular de tejidos en cultivo (Skoog y Miller, 1957). Estudios subsecuentes han sugerido que las citocininas participan en una amplia variedad de procesos de desarrollo como morfogénesis, biogénesis de cloroplastos y senescencia (Kaminek, 1992). Además muchos experimentos han demostrado que las auxinas y las citocininas interactúan para regular varios procesos de crecimiento y desarrollo tales como la organogénesis en cultivos de tejidos y en la dominancia apical en plantas completas (Skoog y Miller, 1957).

El nombre genérico de las citocininas es empleado para aquellas sustancias químicas que pueden estimular la división celular o citocinesis. Casi todas las citocininas

conocidas, tanto naturales como sintéticas, son derivados de la adenina, en los cuales el grupo amino lleva determinados sustituyentes en la posición 6 (Hurtado y Merino, 1987; McGaw, 1988).

La actividad de las citocininas en la división celular, está asociada a la molécula de adenina. En las citocininas sintéticas como BA y cinetina, ésta molécula presenta un anillo purínico intacto y un sustituyente cíclico en la posición N⁶. Aparentemente es esta dimensión molecular masiva del sustituyente la que confiere a las citocininas una mayor actividad. Para otras citocininas la actividad está determinada por la longitud de la cadena lateral sustituyente y por su grado de saturación. En citocininas como la zeatina y Zip, los sustituyentes son cadenas de cinco carbonos no saturadas (Ver lámina 2). Entre las citocininas sintéticas se ha probado que la eficiencia de BA y de Zip es mayor que la de cinetina (Matsubara, 1990).

Los efectos de las citocininas en la expansión celular están acompañados por la extrusión de protones del tejido, incrementando así el potencial eléctrico transmembranal (Zeroni y Hall, 1980).

Las citocininas por otra parte, incrementan el contenido de proteínas (Tepfer y Foslet, 1978), y la actividad de algunas enzimas como endopeptidasas, pirofosfatasas, fosfoenol piruvato carboxilasas (Karavaiko *et al.*, 1978), RNA polimerasa (Kulaeva, 1981) y DNA polimerasa (Vázquez y Reyes, 1990). También incrementan la tasa de biogénesis de cloroplastos y la síntesis de la ribulosa bifosfato carboxilasa (Harvey *et al.*, 1974). Además de adelantar los ciclos celulares y la síntesis replicativa de DNA (Reyes *et al.*, 1991).

Se ha propuesto un amplio número de posibles mecanismos de acción de las citocininas. Debido a que se les ha encontrado unidas a los tRNA, cerca de la posición del anticodón,

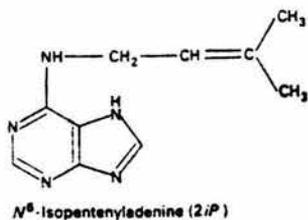
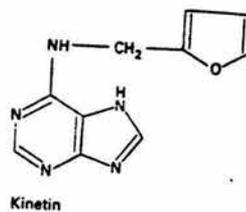
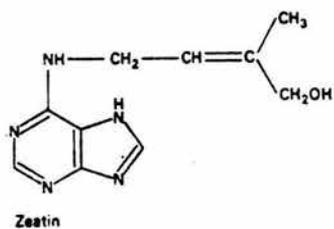


Lámina 2. Estructura química de algunas citocininas sintéticas (Matsubara, 1990).

se ha sugerido que actúan sobre el metabolismo de las proteínas a nivel de la traducción (Thomas, 1977).

Bhattacharya y Roy en 1969 demostraron los efectos de las citocininas en la síntesis de proteínas. Se ha encontrado que las citocininas estimulan la síntesis de proteínas y de RNA en hojas de tabaco (Zeroni y Hall, 1980). Otros trabajos han demostrado que las citocininas se unen a los ribosomas 80S; en pruebas posteriores, se ha encontrado una considerable cantidad de proteínas que reconocen a las citocininas (Cytokinin Binding Protein, CBP), asociadas a los ribosomas; así mismo se ha demostrado que las citocininas incrementan la velocidad de incorporación de aminoácidos marcados a las proteínas sintetizadas, esto sugiere que puede haber una influencia directa sobre los elementos del aparato traductor (Takegami y Yoshida, 1977).

La acción de las citocininas a nivel molecular es desconocido. Al igual que otros fitorreguladores, se piensa que las citocininas interactúan con un receptor protéico específico iniciando una cascada de transducción de señales que finalmente daría los cambios en la expresión genética. Se han identificado muchas proteínas que interactúan con las citocininas (CBP), pero hay muy pocas evidencias acerca de como estas proteínas actúan como receptores (Palme, 1993).

2.4 Cultivo *in vitro* de maíz

Aún cuando se ha reportado el establecimiento de cultivos de tejidos para la mayoría de los cereales, la capacidad de manipular estas especies a nivel celular de manera consistente y práctica sigue siendo un reto (Armstrong y Green, 1985).

La regeneración de plantas de maíz a partir de cultivos *in vitro* se ha logrado principalmente a partir de callos derivados del embrión inmaduro (Green y Phillips, 1975).

de anteras (Ting *et al.*, 1981, citado por Wang, 1987), glumas (Suprasanna *et al.*, 1986), espigas inmaduros (Rhodes *et al.*, 1988), de hojas (Chang, 1983), de mesocótilo (Harms *et al.*, 1976) y de segmentos de plántulas (Santos y Torne, 1986).

Para la obtención de callos friables de maíz se han utilizado principalmente embriones inmaduros como explante, cuya capacidad embriogénica ha sido demostrada en diversos trabajos (Armstrong y Green, 1985); aunque en tejidos maduros (como embriones maduros) se ha visto bastante reducida esta capacidad embriogénica (Dolezelová *et al.*, 1992). El estado fisiológico de los embriones de maíz es una característica muy importante para evaluar la velocidad de respuesta de estos tejidos a las condiciones de cultivo; los embriones inmaduros de maíz presentan una elevada actividad metabólica en relación al estado quiescente de los embriones maduros (Wang, 1987).

Hasta la fecha todos los tejidos usados como explante son obtenidos a partir de plantas vivas, lo cual requiere tiempo y espacio para crecer la planta. La utilización de embriones maduros para éste propósito, permitiría prescindir de dichos requerimientos ya que éste material biológico puede ser almacenado en un espacio reducido y por un tiempo considerable (Wang, 1987).

El establecimiento de células de maíz en suspensión ha enfrentado diferentes problemas en los que están incluidos la friabilidad del callo inoculado, la tendencia de las células a diferenciarse en raíces o en estructuras parecidas a las raíces (root-like structures), lo que se traduce en una reducción en la capacidad de regeneración. El desarrollo de callos friables permite una suspensión con rápido crecimiento y una buena dispersión en las células de maíz reduciendo la competencia por espacio y nutrientes (Green, 1982).

3. SÍNTESIS DE PROTEÍNAS (SP)

La síntesis de proteínas es uno de los mecanismos biosintéticos más complejos, y consume aproximadamente el 90% de la energía química usada para todas las reacciones biosintéticas de una célula (Lehninger *et al.*, 1993; Lewin, 1993).

La velocidad de síntesis de proteínas está relacionada con el estado metabólico de la célula; por ejemplo, la fecundación, la mitosis, la deficiencia de nutrientes, el estrés, y los tratamientos hormonales alteran la síntesis de proteínas (Lewin, 1993).

La síntesis de proteínas es un proceso constituido por una serie de eventos esenciales para la vida tanto en células procariontes como en organismos superiores. Por ser de gran importancia, este proceso debe ser controlado molecular y metabólicamente en cada una de las etapas de la síntesis de polipéptidos. En la síntesis de proteínas están involucrados los tres tipos de RNA, el RNA ribosomal (rRNA), el de transferencia (tRNA) y el mensajero (mRNA). El mRNA contiene la información genética para la síntesis de una proteína. Hay tres tipos de rRNA en procariontes: 5S, 16S y 23S y cuatro en eucariontes 5S, 5.8S, 18S y 26S, los cuales se encuentran formando parte constitutiva del ribosoma junto con las proteínas ribosomales. El tRNA es la molécula adaptadora en la traducción del mensaje y contiene el anticodón, triplete que reconoce al codón correspondiente en el mRNA (Lewin, 1993; Lehninger *et al.*, 1993;). Los ribosomas son los principales componentes celulares involucrado en la síntesis de proteínas y el sitio físico donde se reúnen las proteínas necesarias para la realización de este proceso (Lewin, 1993).

3.1 Ribosomas

Se encuentran aproximadamente 20 000 ribosomas por célula y constituyen la cuarta parte de la masa celular. El tamaño de los ribosomas depende del organismo, en

eucariontes estas partículas son mayores que en los procariontes. Por su velocidad de sedimentación se clasifican en 80S en eucariontes y 70S en procariontes; dado que los ribosomas se encuentran divididos en dos subunidades desiguales, una mayor y otra menor se ha determinado de la misma manera a la subunidad mayor como 60S en eucariontes y 50S en procariontes y a la subunidad menor como 40S y 30S respectivamente (Lewin, 1993).

Los ribosomas son macromoléculas compuestas por ácidos ribonucleicos (RNA) y proteínas. En eucariontes la subunidad mayor contiene aproximadamente 47 proteínas ribosomales diferentes y tres moléculas de rRNA 5S, 28S y 5.8S. La subunidad menor contiene un sólo tipo de rRNA, el 18S, además de 30 proteínas ribosomales aproximadamente (Lewin, 1993), (Ver lámina 3)

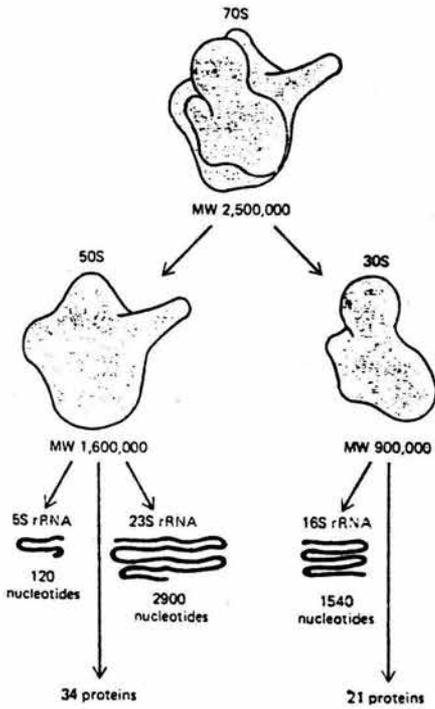
Los ribosomas de todos los organismos están divididos en dos regiones funcionales: el dominio de traducción que comprende cerca de las dos terceras partes de la estructura del ribosoma, y el dominio de salida; estos dominios se encuentran cerca de los extremos opuestos del ribosoma. El dominio de traducción comprende la cabeza, la plataforma de la subunidad menor y el tallo (Hill *et al.*, 1990). El tallo es uno de los aspectos más característicos en la estructura de la subunidad mayor, es una protuberancia lateral muy flexible formada por un complejo pentamérico de proteínas compuesto por dímeros de las proteínas L12 y L7, asociados a una copia de L10 en bacterias; en eucariontes este tallo está constituido por las proteínas P1 y P2 dispuestas también en dímeros, asociadas a una copia de P0 (Ballesta y Remacha, 1996).

La función biológica de los ribosomas es compleja en eventos tales como el reconocimiento entre el codón del mRNA y el anticodón del tRNA, la captación del mRNA, la unión de los aminoacil-tRNAs específicos, la formación de enlaces peptídicos y la transposición física del ribosoma a lo largo del mRNA (Lewin, 1993).

Los ribosomas se unen al mRNA en o cerca del extremo 5' del codón de inicio; leyendo un codón a la vez y moviéndose hacia el extremo 3' a lo largo del mRNA hasta completar la síntesis secuencial de la proteína. La transposición de los ribosomas a lo largo del mRNA, se da por un proceso mecanoquímico dependiente de GTP (Stryer, 1988). Una molécula de mRNA se asocia con varios ribosomas, formando así los polisomas (Steiner y Pomerantz, 1981). El tamaño del polisoma depende de la longitud del mensajero y de la frecuencia de ribosomas unidos a éste; en promedio hay 8 ribosomas unidos (en

Ribosoma

procarionte



Ribosoma

eucarionte

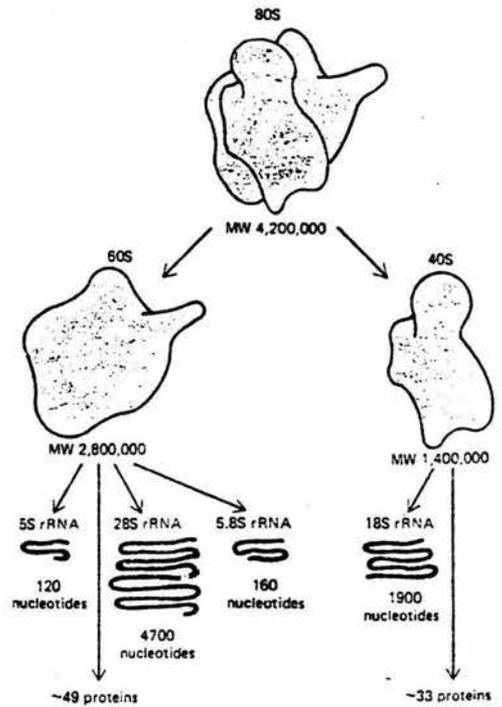


Lámina 3. Ribosomas procariontes y eucariontes (Lehninger et al., 1993).

diferentes posiciones sobre el mRNA) simultáneamente (Lewin, 1993). Cada ribosoma sintetiza un sólo polipéptido. El mensajero en organismos eucariontes generalmente codifica para una proteína (monocistrónico), mientras que para procariontes se encuentra el molde para varias proteínas (policistrónico) (Lewin, 1993).

En las células de eucariontes algunos ribosomas están libres en el citosol, mientras que otros están unidos a un extenso sistema membranoso llamado retículo endoplásmico (ER) que abarca aproximadamente la mitad del total de la membrana celular. La región a la que se unen los ribosomas se llama ER rugoso por medio de la subunidad mayor (Dahlberg, 1989).

La formación de ribosomas es un proceso que responde a la variación en el nivel de los nutrientes celulares, a los diferentes estados de desarrollo celular y a la presencia de reguladores de crecimiento y hormonas. Se ha sugerido que existe una estrecha relación entre la proliferación celular y la formación de ribosomas (Lewin, 1993).

3.2 Proteínas ribosomales ácidas (PRAs)

La mayoría de las proteínas que constituyen al ribosoma son proteínas básicas, sin embargo, la presencia de algunas proteínas ácidas es una característica universal de los organismos de los tres dominios, arqueobacterias, eubacterias y eucariontes (Bermejo et al., 1994). Dichas proteínas se caracterizan por tener un punto isoelectrico entre 3 y 4 y una masa molecular de aproximadamente 12 a 16 kDa (Ballesta y Remacha, 1996).

Las proteínas ácidas se encuentran en la subunidad mayor de los ribosomas formando una protuberancia lateral flexible llamada tallo (Ver lámina 4). Se ha propuesto que este tallo participa durante la síntesis de proteínas, en la interacción entre los factores de elongación y el ribosoma. Los componentes correspondientes al tallo de los ribosomas eucariontes muestran características similares a sus contrapartes en procariontes y se ha aceptado que juegan una función análoga sobre la maquinaria básica de síntesis de proteínas. (Ballesta y Remacha, 1996).

Las proteínas ácidas del ribosoma han sido denominadas de diferente manera dependiendo del organismo en estudio; en este trabajo estas proteínas son llamadas siguiendo la clasificación propuesta por Wool y colaboradores (1991), donde se sugiere

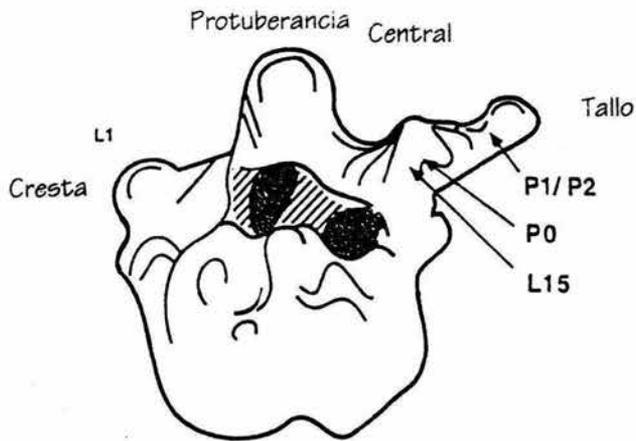


Lámina 4. Subunidad mayor del ribosoma eucarionte, mostrando la ubicación de las proteínas ácidas (Ballesta y Remacha, 1996).

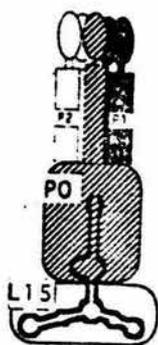


Lámina 5. Estructura pentamérica formada por las proteínas ribosomales ácidas en el tallo de la subunidad mayor del ribosoma (Ballesta y Remacha, 1996).

asignarlas como proteínas A en procariontes y como proteínas P en eucariontes. Las primeras están representadas por las proteínas L7 y L12 y son análogas a P1 y P2 encontradas en eucariontes (Wool *et al.*, 1990).

Las proteínas A y P ribosomales tienen propiedades fisicoquímicas y pesos moleculares similares, y parecen tener la misma función en la síntesis de proteínas. Las proteínas P difieren de las proteínas A en que las primeras están codificadas en genes independientes (Ballesta *et al.*, 1993), mientras que las A (L7/L12) están codificadas en el mismo gene y sólo hay cambios a nivel postraduccional, (Payo *et al.*, 1995). Entre estas proteínas ribosomales ácidas, sólo las proteínas P se fosforilan en el ribosoma y aparentemente es esta modificación la que permite su integración a la subunidad mayor durante el ensamblaje de los ribosomas (Bermejo *et al.*, 1994). Un número considerable de proteínas P se encuentra en el citoplasma y son intercambiables con las presentes en el ribosoma, mientras que en células procariontes las proteínas A se encuentran asociadas al ribosoma (Ballesta *et al.*, 1993).

Las proteínas P que se encuentran en el citoplasma se incorporan al ribosoma, después de iniciarse la traducción del mensaje, y son liberadas nuevamente cuando el ribosoma deja al mensajero después de la terminación. Este intercambio está mediado por la fosforilación de las proteínas ácidas; se ha demostrado que esta modificación afecta la afinidad de estos péptidos por el ribosoma drásticamente (Saenz-Robles *et al.*, 1990).

El extremo carboxilo es muy similar en todas las proteínas P de los organismos eucariontes; el alto grado de conservación de esta estructura sugiere que tiene una función importante, debido a que queda aparentemente expuesta al medio externo, probablemente interactúa con los factores de elongación. La secuencia de los 17 aminoácidos del extremo carboxilo de las proteínas P0, P1 y P2 son casi idénticas y está altamente conservada entre las especies (Hasler *et al.*, 1991).

La proteína P0 fue reportada por primera vez en ribosomas de pollo como una proteína no ácida con una masa molecular de 40 kDa, la cual reaccionaba con los anticuerpos específicos para P1 y P2 (Towbin, 1982, citado en Ballesta y Remacha, 1996). Posteriormente la proteína P0 se ha encontrado en los ribosomas de otros eucariontes (Ballesta y Remacha, 1996).

La cercana relación funcional y estructural entre las proteínas P ácidas con la proteína PO lleva a considerar que PO puede también estar implicada en los mecanismos de regulación en los que las proteínas P parecen participar (Santos y Ballesta, 1994).

Dada la similitud entre las secuencias de PO y L10 no es sorprendente que se proponga una homología funcional entre ambas; PO es más grande que L10 y tiene una prolongación en el extremo carboxilo cuya secuencia de aminoácidos es muy similar a la presente en las proteínas ácidas P1 y P2. Esta estructura sugiere una fusión entre una proteína parecida a L10 (L10-like) y una proteína ácida. La proteína PO se une directamente con el rRNA en el dominio GTPasa; esta interacción es mucho más fuerte que en los ribosomas bacterianos (Ballesta y Remacha, 1996).

En bacterias se ha demostrado que los dímeros de L7 y L12 interactúan con el extremo carboxilo de la proteína L10 logrando un pentámero extremadamente estable (Ver lámina 5). Este complejo (L7/L12)₄-L10 se une a través del dominio amino de L10 al 23S rRNA, dejando el extremo carboxilo expuesto hacia el citoplasma formando la señal (pit) del tallo. La posición del sitio de unión del pentámero al rRNA 23S está comprendida entre las posiciones 1000 y 1200 de la secuencia nucleotídica del rRNA 23S y está altamente conservada en los ribosomas de todas las especies. Esta región del rRNA 23S se sobrelapa con el dominio GTPasa. Este sitio es responsable de las reacciones hidrolíticas traduccionales del GTP asociadas a las reacciones de elongación de la cadena peptídica y es un sitio importante para el reconocimiento de los factores de elongación (Ballesta y Remacha, 1996). En eucariontes se ha demostrado que las proteínas P ácidas también forman una estructura pentamérica, llamada complejo P, el cual consiste en la unión de los homodímeros formados por P1 y P2 unidos a PO por su extremo amino terminal (Hasler *et al*, 1991; Santos y Ballesta, 1994). Esto sugiere una similitud funcional entre PO y la proteína bacteriana L10.

Las PRAs, en contraste con el resto de las proteínas estructurales del ribosoma, están presentes en más de una copia por ribosoma (Payo *et al*, 1995). Se ha demostrado que la cantidad de PRAs presentes en el ribosoma no es constante y que depende del estado metabólico de la célula (Saenz-Robles *et al*, 1990).

3.2.1 Fosforilación de Proteínas Ribosomales

La fosforilación es un tipo de modificación covalente, reversible, que regula la actividad de muchos enzimas y otras proteínas. Las proteínas que catalizan estas reacciones son las proteínas cinasas, las cuales transfieren un grupo fosfato de un nucleótido trifosfatado a residuos aminoácidos como la serina, treonina o tirosina. Las proteínas fosfatasa revierten el efecto de las cinasas catalizando la hidrólisis de los grupos fosfato unidos a las proteínas. Las cinasas específicas fosforilan a una sola proteína y las cinasas multifuncionales fosforilan a varias proteínas semejantes entre sí. Está bien establecido que la fosforilación y defosforilación de proteínas es un importante mecanismo de regulación de la actividad celular en respuesta a una amplia variedad de estímulos tanto internos como externos (Stryer, 1988).

Entre las proteínas fosforiladas, se han reportado algunas proteínas ribosomales en levaduras incluidas las proteínas ácidas del ribosoma (Ballesta *et al*, 1993). A diferencia de las proteínas ribosomales ácidas asociadas al ribosoma, las proteínas P presentes en el citoplasma no están fosforiladas (Ballesta y Remacha, 1996). En *Saccharomyces cerevisiae* se ha reportado que la serina es el único aminoácido modificado y que sólo un grupo fosfato se incorpora por proteína; en mamíferos se ha encontrado que las proteínas P1 y P2 están multifosforiladas en los ribosomas (Wool *et al*, 1991). Esta modificación parece causar dramáticos cambios estructurales los cuales afectan la afinidad de estos péptidos por el ribosoma. La fosforilación de P1 y P2 permite su ensamblaje al ribosoma. El intercambio entre las PRAs citoplásmicas y el ribosoma, muy probablemente se da a través de un proceso activo de fosforilación y defosforilación relacionado con la población de proteínas P presentes en el ribosoma (Saenz-Robles *et al*, 1990).

La ubicación del sitio de fosforilación se encuentra en el extremo carboxilo de las proteínas ácidas. en dicho sitio se encuentra un grupo de residuos aminoácidos ácidos rodeando los sitios potenciales de fosforilación, ubicados en las serinas 102 y 105; esta secuencia corresponde al consenso de reconocimiento para las caseín cinasas tipo II (CK II) (Hasler *et al*, 1991); aunque se han reportado varias proteínas cinasas capaces de fosforilar *in vitro* a las PRAs. En *S. cerevisiae* la Caseín cinasa tipo II, fosforila a P1, P2 y a P0, sin embargo, una cinasa purificada de maíz sólo fosforila a P2 (Sepúlveda *et al*, 1995; citado en Ballesta y Remacha, 1996), sugiriendo la existencia de proteínas-cinasas específicas para cada proteína P (Ballesta y Remacha, 1996).

Las proteínas ácidas del ribosoma pueden ser consideradas como resultado de un reciente evento evolutivo, debido a que al igual que los factores de elongación, no son componentes esenciales de la maquinaria básica de síntesis de proteínas. (Ballesta *et al.*, 1993). Los ribosomas son capaces de participar en la síntesis de proteínas en ausencia de las proteínas ácidas, aunque el proceso de síntesis en estas condiciones, es mucho menos eficiente y al parecer, la traducción de los mRNA es desigual, afectando más a unos mensajeros que a otros (Ballesta y Remacha, 1996).

3.3 Traducción

La síntesis de proteínas o traducción, es un proceso en el que el alfabeto de ácidos nucleicos, constituido por cuatro letras que corresponden a las cuatro bases nitrogenadas se traduce al alfabeto de 20 aminoácidos de las proteínas (Stryer, 1988). La información genética específica para cada una de las proteínas se encuentra organizada en los codones transcritos del molde de DNA en el RNA mensajero (Lehninger *et al.*, 1993).

El proceso de traducción pasa por diferentes etapas, cada una de las cuales está caracterizada por la presencia de factores específicos (Lewin, 1993).

3.3.1 Activación de Aminoácidos

Es la primera etapa de la traducción y ocurre en el citosol; consiste en la unión covalente de cada aminoácido a su respectivo RNA de transferencia (tRNA); esta reacción es catalizada por las aminoacil-tRNA sintetasas dependientes de Mg^{++} , a expensas de la energía proporcionada por el ATP (Lehninger *et al.*, 1993). Los aminoácidos una vez activados, son transportados a los ribosomas por las moléculas de tRNA específicas (Stryer, 1988).

3.3.2 Iniciación

Es la segunda etapa del proceso de traducción y se da cuando el mRNA se une a la subunidad menor del ribosoma. La selección del mensajero y su unión al ribosoma están

promovidas por los factores de iniciación (IF); en eucariontes se conocen nueve factores de iniciación (eIF) (Lehninger *et al.*, 1993). La unión entre el mensajero y la subunidad menor del ribosoma se da por la secuencia "cap" presente en el extremo 5' del mRNA reconocida por el factor eIF-4E el cual forma parte del factor de iniciación multimérico eIF-4F, en el que también se encuentra el eIF-4A cuya función consiste en relajar la estructura secundaria del mensajero (Lewin, 1993).

La tarea esencial llevada a cabo en el proceso de iniciación es la orientación del aminoacil-tRNA en forma tal que el código de tripletes del mRNA sea leído en el marco apropiado. El reconocimiento del codón de iniciación es dirigido por la información contenida en el mRNA y la subunidad 40S, actuando sincronizadamente con tres factores de iniciación eIF1, eIF2 y eIF3. El complejo de iniciación se forma gradualmente; primero la subunidad 40S forma con el factor eIF3 un complejo binario, el cual se une a determinada región del mRNA ubicada hacia el extremo 5' en donde se encuentra el codón de inicio AUG (Metionina). Una vez establecido el complejo 40S-eIF3-mRNA, se promueve la unión del metionil-tRNA la cual es dirigida por el factor eIF2 y el GTP. El complejo eIF2-GTP se une al complejo mRNA-40S ayudado por el factor eIF1 y acompañado de la liberación de eIF3. El ensamblaje de la subunidad 60S al complejo mRNA-40S-eIF2-GTP completa la formación del complejo de iniciación 80S dándose simultáneamente la hidrólisis de GTP a GDP y Pi y la liberación de los factores eIF2 y eIF1 (Stryer, 1988; Lehninger *et al.*, 1993; Lewin, 1993).

Los sitios que son reconocidos por los tRNAs en el ribosoma son el sitio peptidilo (P) en el que el peptidil-tRNA transfiere el grupo carboxilo esterificado y el sitio aceptor (A) al cual se une el aminoacil-tRNA entrante. El aminoacil-tRNA correspondiente al codón de inicio AUG (Met-tRNA) se une al sitio P (peptidilo) de la subunidad mayor por la hidrólisis de GTP y la subsecuente liberación del IF2 en forma de IF2-GDP. El tRNA es liberado y la unidad metionina activada se une al grupo amino del aminoacil-tRNA situado en el sitio A. Esta reacción es catalizada por la actividad peptidiltransferasa, localizada en la subunidad mayor del ribosoma (Steiner y Pomerantz, 1981). Se encuentran dos tipos de tRNA específicos para metionina en todos los organismos; un tRNA es usado exclusivamente cuando AUG representa el codón de inicio para la síntesis de proteínas (fMet-tRNA en bacterias y Met-tRNA_i en eucariontes) y el otro es usado cuando la metionina es transferida hacia una posición interna de la cadena peptídica (Met-tRNA) (Lehninger *et al.*, 1993).

3.3.3 Elongación

La elongación es el crecimiento de la cadena polipeptídica y se da por la adición consecutiva y precisa de aminoácidos. La elongación necesita del complejo de iniciación, del siguiente aminoacil-tRNA, específico para el siguiente codón del mRNA y de ciertas proteínas citoplásmicas solubles (tres en eucariontes), llamadas factores de elongación (EF-1a, EF-1b y EF-2) y de GTP (Lehninger *et al.*, 1993). Las proteínas ácidas del ribosoma (PRAs) participan en esta fase del proceso de síntesis de proteínas al interactuar con los factores de elongación.

Cada paso en el proceso de elongación requiere 1) la unión dirigida por codones de aminoacil-tRNA (anticodón) hacia un sitio de unión (sitio A) del ribosoma, el cual en el primer paso es adyacente a otro sitio ocupado por Met-tRNA_i (sitio P), y que en los pasos sucesivos es ocupado por peptidil-tRNA; 2) la formación de enlaces peptídicos entre metionil-tRNA o peptidil-tRNA y el aminoácido recientemente unido y 3) la translocación del mRNA y el peptidil-tRNA recientemente sintetizado al sitio ocupado por el tRNA liberado. En este paso están implicados la liberación del tRNA desactivado y la orientación del ribosoma, de tal forma que el siguiente codón del mRNA sea capaz de dirigir la unión del anticodón presente en el tRNA específico (Lehninger *et al.*, 1993).

La elongación es un proceso cíclico que se repite hasta encontrar el codón de término o sin sentido.

3.3.4 Terminación

Este proceso se da por el reconocimiento de alguno de los codones de término (UAA, UGA o UAG), para los cuales no se encuentra un anticodón correspondiente en las moléculas de tRNA, por lo que la aparición de tales codones en el mensaje interrumpe el alargamiento de la cadena y se promueve la liberación del peptidil-tRNA desde el extremo carboxilo de la cadena peptídica. El codón de término proporciona al ribosoma una señal para la unión de los factores de liberación (RF), los cuales tienen tres consecuencias inmediatas: 1) la separación de la cadena polipeptídica que está unida a la molécula de tRNA en el lugar P; 2) la liberación de la molécula de tRNA del ribosoma y 3) la disociación del ribosoma en sus dos subunidades (Strickberger, 1988). Finalmente

se ha sintetizado una proteína y la maquinaria de síntesis queda disponible para reiniciar este proceso.

La eficiencia de la maquinaria de síntesis de proteínas, es un factor determinante en el desarrollo y la división celular, por lo que a este nivel, es posible localizar diferencias que permitan explicar la mayor o menor eficiencia de este proceso en las células.

III DISEÑO EXPERIMENTAL

Este trabajo está fundamentado en dos partes experimentales:

- 1) Establecimiento *in vitro* de cultivos de células en suspensión usando callos de embriones maduros e inmaduros de maíz (*Zea mays* L.) de la raza "Tuxpeño" como inóculo.
- 2) Evaluación de algunas características de la maquinaria de síntesis de proteínas en los cultivos celulares obtenidos por callos de embriones maduros (SEM), por callos de embriones inmaduros (SEI) y de los cultivos SEM tratados con medio condicionado (SMC).

El establecimiento de los cultivos *in vitro* de células en suspensión de maíz a partir de embriones maduros e inmaduros, es un proceso que requiere de la inducción y proliferación de callo sobre medios de cultivo sólidos; los callos de embriones inmaduros fueron una donación, por lo que no se incluye la descripción de esta metodología.

Las pruebas realizadas sobre los cultivos en suspensión están basadas principalmente en cambios sobre la composición del medio, el cual fue modificado mediante:

a) la aplicación de diferentes reguladores de crecimiento incluidos en el grupo de las citocininas como son, N⁶ furfural-aminopurina (cinetina, KIN), la cual se probó a dos diferentes concentraciones, una de 0.01 mg L⁻¹ (KIN1) y la otra de 0.1 mg L⁻¹ (KIN2); la citocinina N⁶ benzil-adenina (BA) y N⁶ isopentiladenina (2ip) fueron probadas a una concentración de 0.1 mg L⁻¹.

b) la adición del suplemento de vitaminas (Vitaminas VMS*), modificado de las vitaminas del medio MS en los tratamientos KIN1 y KIN2, así como en los cultivos tratados con BA y 2ip; o bien por la adición del suplemento de aminoácidos, (Coctel 20, "C") sobre

cultivos tratados con BA y 2ip. Estos suplementos se describen en la Tabla 2 del Apéndice.

La respuesta generada por las células a los medios de cultivo probados fueron evaluadas por los parámetros de crecimiento peso fresco (PF), peso seco (PS) y paquete celular (PC).

De esta manera pudo seleccionarse el medio de cultivo más productivo y reproducir el fenómeno en los SEM y SEI para lograr establecer el cultivo SMC.

El crecimiento de los cultivos SEM como respuesta a la adición del medio condicionado fue evaluado por los parámetros convencionales (PC PF y PS).

El efecto del medio condicionado sobre el aparato traductor de los cultivos SEM fue analizado en base al contenido de proteínas ribosomales ácidas, rendimiento de ribosomas, cuantificación de proteínas de la fracción posribosomal y velocidad de síntesis de proteínas *in vivo*. Las fracciones ribosomal y posribosomal fueron separados por centrifugación, la velocidad de síntesis de proteínas *in vivo* fue calculada por la cantidad de ³⁵S-Metionina incorporada durante la fase de crecimiento exponencial del cultivo y la presencia de proteínas ribosomales ácidas (PRAs) fue detectada por isoelectroenfoque (IEF).

A continuación se representa a manera de diagrama, la ruta seguida para establecer y evaluar los cultivos celulares de maíz en suspensión. (Diagrama 1). De la misma manera queda representada la secuencia de los tratamientos probados para la elección del medio de cultivo que favorezca las condiciones de crecimiento en los cultivos celulares generados a partir de callos de embriones maduros de maíz (Diagrama 2) y finalmente las pruebas bioquímicas realizadas sobre los cultivos celulares con el fin de evaluar las características mencionadas sobre la maquinaria de síntesis de proteínas (Diagrama 3).

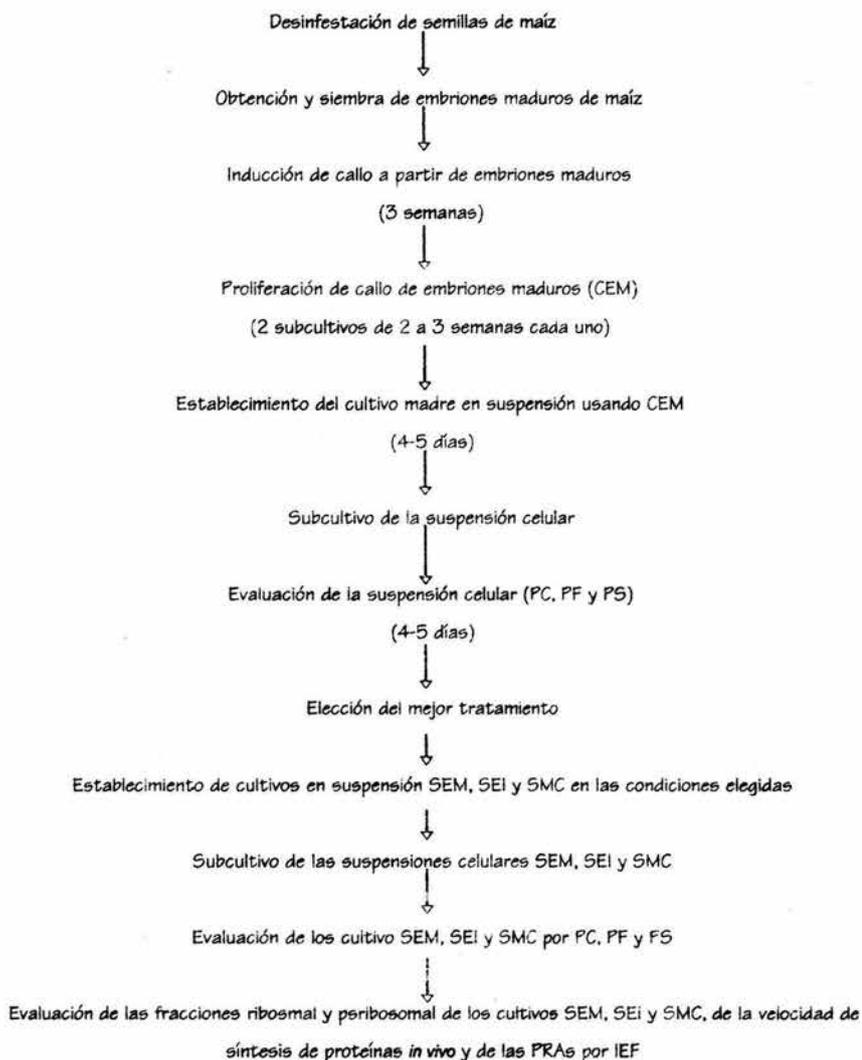


Diagrama 1. Representación esquemática de la secuencia experimental seguida para el cumplimiento de nuestros objetivos.

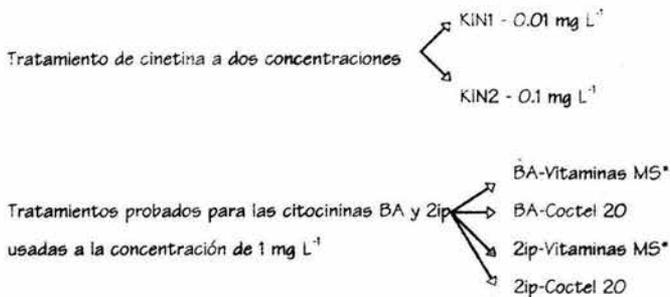


Diagrama 2. Tratamientos probados en cultivos en suspensión obtenidos a partir de callos generados por embriones maduros de maíz



Diagrama 3. Evaluaciones realizadas a las células obtenidas por SEM⁽¹⁾, SEI⁽²⁾ y SMC⁽³⁾

¹ SEM= Suspensión celular obtenida por callos de embriones maduros
² SEI= Suspensión celular obtenida por callos de embriones inmaduros
³ SMC= Suspensión de SEM con medio condicionado
⁴ IEF= Isoelectroenfoque
⁵ PRAs= Proteínas Ribosomales Ácidas

IV MATERIALES Y MÉTODOS

1 Material Biológico

Se utilizaron embriones maduros de maíz *Zea mays* L. de la raza "Tuxpeño" y ejes embrionarios de semillas maduras de maíz de la raza "Chalqueño". Los cultivos de callo generados a partir de embriones inmaduros de la raza Tuxpeño, fueron proporcionados por Octavio Guerrero Andrade del Depto. de Bioquímica y Farmacia de la División de Posgrado de la Facultad de Química en la UNAM. El material biológico empleado en este trabajo procede del INIFAP de Zacatepec Morelos.

1.1 Desinfestación de semillas de maíz

Lotes de 300 semillas de maíz Tuxpeño se sometieron a un proceso de desinfestación, el cual consistió en lavar a las mismas en 500 ml de una solución que contenía hipoclorito de sodio comercial (cloralex) al 50% v/v, con 900 µl de microdin (como germicida) y 500 µl de tween 20 por cada 500 ml, durante 20 minutos en agitación constante; se procedió a enjuagar las semillas con agua desionizada estéril 4 veces durante 5 minutos cada una; se dejaron 30 minutos en una solución estéril de fungicida captan al 40% p/v en agitación, para después enjuagar 4 veces con agua desionizada estéril durante 5 minutos cada vez. Las semillas desinfestadas se colocaron en cajas de petri estériles sobre una cama de papel adsorbente previamente humedecido con agua desionizada en las que permanecieron 48 hrs a 4° C en oscuridad, posteriormente se disectaron los embriones y se sembraron en los medios de cultivo como se indica posteriormente.

Todo el procedimiento de esterilización y de siembra se realizó en campana de flujo laminar y el material utilizado, tanto de cristalería como pinzas y navajas fueron previamente esterilizadas a 116-120° C durante 30 min.

1.2 Obtención y siembra de embriones maduros de maíz

Los embriones de maíz fueron separados manualmente del endospermo, dejando íntegros al eje embrionario y al escutelo. La siembra consistió en colocar 4 a 5 embriones sobre el medio de cultivo sólido dejando el eje embrionario en contacto con el medio de cultivo.

2 Composición de los Medios de Cultivo

Los medios de cultivo utilizados son modificaciones hechas sobre el medio de cultivo R2 propuesto por Sánchez de Jiménez y colaboradores (1981), el cual es a su vez una modificación del medio básico de Murashige y Skoog (MS) (Ver apéndice tabla 1)

En la preparación de los medios de cultivo probados en este trabajo, se utilizó azúcar refinada comercial en medios de cultivo sólidos y sacarosa en medios de cultivo líquidos, al 3% en ambos casos (p/v); 200 mg L⁻¹ de hidrolizado de caseína, 2.3 g L⁻¹ de L-prolina en medios de cultivo para inducción de callo y 0.76 g L⁻¹ para medios de cultivo de proliferación de callo y de células en suspensión; como medio de soporte se utilizó el gelificante conocido como Phytigel (Sigma) al 0.27% (p/v); el pH se ajustó a 5.7 en medios sólidos y a 5.0 en medios líquidos. La auxina empleada fue el MCPP a una concentración de 6 mg L⁻¹ para inducción de callo y 4 mg L⁻¹ para proliferación de callo y para cultivos en suspensión. La citocinina BA se aplicó a una concentración de 0.1 mg L⁻¹ únicamente en los medios de proliferación de callo.

Para facilitar la preparación de medios de cultivo se prepararon soluciones madre 100 veces concentradas de los diferentes componentes que constituyen a cada medio. Para la preparación del medio sólido, estas soluciones se combinaron (siguiendo la composición de cada medio) y se ajustó su pH aforando a la mitad del volumen final deseado, en la

otra mitad se disolvió el phytagel en el volumen de agua necesario para alcanzar el volumen final calculado. Se homogeneizaron ambas partes y se sirvió el medio (20 ml por frasco) en frascos tipo gerber con tapa previamente esterilizados. El medio líquido sólo requirió de la mezcla de los componentes del medio, ajustar el pH y aforar al volumen calculado. Siempre se utilizó agua desionizada. Ambos tipos de medios de cultivos se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 18 minutos.

3 Cultivo *in vitro* de embriones maduros de maíz

3.1 Condiciones de siembra e incubación

Todas las siembras y resiembras tanto de callos como de cultivos en suspensión se realizaron en condiciones de asepsia. Los cultivos fueron incubados a temperatura ambiente ($24 \pm 2^\circ \text{C}$) y en condiciones de oscuridad permanente.

3.2 Inducción de callo

La fase de inducción consistió en la obtención de callo a partir de embriones maduros, los cuales después de ser desinfectados y disectados como se indicó anteriormente, se sembraron en medio sólido para inducción de callo, en el cual se mantuvieron de dos a tres semanas.

3.3 Proliferación de callo

En la etapa de proliferación, el callo generado fue separado del tejido madre para resembrarlo en el medio de proliferación, en el cual permaneció durante dos semanas más, después de las cuales se hizo necesario otro subcultivo para renovar el medio y depurar el callo de raíces y otras estructuras diferenciadas.

4 Establecimiento de cultivos en suspensión

4.1 Condiciones de siembra e incubación

El establecimiento de cultivos en suspensión se logró inoculando 6 gramos de callo de embrión maduro (CEM) en 60 ml de los medios de cultivo de prueba (se describen en el punto 3.6); estos cultivos (cultivos madre), fueron contenidos en matraces erlenmeyer de 250 ml usando tapones hechos con gasa y algodón para cubrirlos; se mantuvieron en agitación constante en un agitador orbital (Lab-Line) a 100 rpm durante 4 días (a excepción del primer tratamiento que fue incubado por 8 días).

4.2 Subcultivo de la suspensión celular

Los subcultivos se hicieron después de 4 días de la siembra, pasando la suspensión de todas las repeticiones a través de una tela de gasa para eliminar al tejido madre y homogeneizar los cultivos de un mismo tratamiento. La suspensión filtrada se dejó en reposo para precipitar a las células suspendidas y después de extraer la mitad del volumen final del medio de cultivo, este se sustituyó de la siguiente manera: 1) por un volumen equivalente de medio de cultivo nuevo, en cuya composición se aumentó la

concentración de micronutrientes y macronutrientes, así como de la fuente de carbono en un 50%; 2) por medio condicionado (Ver punto 4.5). Las suspensiones subcultivadas se dividieron en porciones de 60 ml para cada matraz y se mantuvieron en agitación a 100 rpm.

4.3 Tratamientos probados sobre la composición de los medios de cultivo

Con el fin de encontrar las condiciones adecuadas para el establecimiento de cultivos celulares en suspensión usando callos obtenidos a partir de embriones maduros de maíz, se hicieron diferentes pruebas sobre la composición del medio de cultivo basal R2 (ver apéndice, Tabla 1). Se probaron tres citocininas, una de ellas (cinetina), a dos diferentes concentraciones, las cuales se especifican en los tratamientos correspondientes. También fueron utilizados los complementos denominados Vitaminas MS* (VMS*) y Coctel 20 (C). (Ver apéndice Tabla 2) . En cada tratamiento se incluyeron cinco repeticiones.

Medio de cultivo KIN1 (R2)

0.01 mg L⁻¹ de cinetina, VMS* (10 ml L⁻¹) y 0.01 mg L⁻¹ de glicina.

Medio de cultivo KIN2

0.1mg L⁻¹ de cinetina; VMS* (10 ml L⁻¹) y 0.01 mg L⁻¹ de glicina.

Medio de cultivo BA-C

0.1 mg L⁻¹ de BA; coctel 20 (10 ml L⁻¹) y 0.1 mg L⁻¹ de adenina.

Medio de cultivo BA-VMS*



0.1 mg L^{-1} de BA; VMS* (10 ml L^{-1}) y 0.01 mg L^{-1} de glicina .

Medio de cultivo 2ip-C

0.1 mg L^{-1} de 2ip; coctel 20 (10 ml L^{-1}) y 0.1 mg L^{-1} de adenina.

Medio de cultivo 2ip-VMS*

0.1 mg L^{-1} de 2ip; VMS* (10 ml L^{-1}) y 0.01 mg L^{-1} de glicina .

4.4 Establecimiento de cultivos celulares a partir de callos de embriones inmaduros

De los tratamientos probados se eligió al más productivo y se reprodujeron las mismas condiciones para el cultivo madre y para el subcultivo antes mencionadas, con un tiempo de incubación de 4 días, después de los cuales se realizó el subcultivo o la evaluación del cultivo, según sea el caso. Este tratamiento fue reproducido tanto para las células provenientes de callos obtenidos por embriones maduros (SEM) inoculando 6 g de callo en 60 ml de medio, como para las células obtenidas de los callos procedentes de embriones inmaduros (SEI) inoculando 4 g de callo en 60 ml de medio de cultivo.

4.5 Efecto del medio condicionado sobre los cultivos en suspensión obtenidos por callos de embriones maduros

Los cultivos SEM obtenidos como se mencionó en el punto 3.7, fueron subcultivados con un medio de cultivo conformado en un 50% por el medio correspondiente al tratamiento elegido (incrementando, como anteriormente, la concentración de macro y micronutrientes, así como la de sacarosa en un 50% sobre la concentración usada para

el establecimiento del cultivo madre). El otro 50% corresponde al medio condicionado, el cual fue separado de las células en él suspendidas, por centrifugación a 2000 rpm durante 10 min. Ambas porciones se mezclaron en el momento del subcultivo conformando así el medio condicionado que reemplace al medio "viejo" extraído de los cultivos madre durante el subcultivo.

5. Evaluación de los cultivos celulares en suspensión

La evaluación de las suspensiones celulares nos permitió valorar la respuesta de los cultivos a las condiciones manipuladas. Estas respuestas fueron evaluadas por el crecimiento de los cultivos y por la eficiencia de la maquinaria de síntesis de proteínas. A continuación se describen los parámetros que fueron considerados en este trabajo para representar el comportamiento de los cultivos durante el tiempo y las condiciones de incubación.

5.1 Evaluación por paquete celular, peso fresco y peso seco

Los cultivos en suspensión fueron evaluados después del primer subcultivo, midiendo PC, PF y PS como parámetros de crecimiento, los cuales se registraron a intervalos de 24 horas durante 4 días (a excepción de los cultivos KIN1 y KIN2, los cuales fueron evaluados por 8 días en la primera prueba), tomando un registro inicial (T_0) en el momento del subcultivo. La toma de muestras se hizo en la campana de flujo laminar con todo el material de cristalería estéril.

El PC se midió usando tubos de hematocrito graduados de 0.5 ml, en los cuales fue vertido el cultivo usando pipetas Pasteur largas. Los tubos se centrifugaron a 2000

rpm durante 10 minutos para formar el paquete celular y poder registrar el volumen ocupado por las células (volumen celular).

El PF se obtuvo tomando alícuotas de 2 ml del cultivo para cada repetición, se filtró la suspensión al vacío hasta eliminar completamente el líquido. Se usó un matraz kitasato con un embudo büchner en el cual se colocó un círculo de papel filtro seco de peso conocido el cual se resta al peso obtenido en una balanza analítica, inmediatamente después de filtrar la muestra para registrar el PF neto.

El PS se obtuvo a partir de la misma muestra tomada para el PF, la diferencia es que se dejaron secar dos días a temperatura ambiente en cajas de petri para aislarlas del polvo.

Estos parámetros de crecimiento se tomaron por triplicado en tres de las cinco repeticiones disponibles para cada tratamiento, dejando a las otras dos como respaldo, en caso de pérdida por contaminación. Las curvas de crecimiento se obtuvieron por el promedio de estas repeticiones graficando estos datos a través del tiempo; en las gráficas de crecimiento representadas en forma de barras, sólo se muestran los promedios mínimos y los máximos alcanzados en un tiempo por cada cultivo celular, expresando sus respectivas desviaciones estándar.

Una vez registradas las diferentes etapas de crecimiento del cultivo, se ubicó a la fase exponencial, caracterizada por una activa división celular. En el caso de la prueba de medio condicionado las células de los cultivos SEM, SEI y SMC fueron cosechadas en esta fase de crecimiento para realizar las evaluaciones correspondientes.

5.2 Evaluación de algunas características del aparato traductor

Las siguientes pruebas se realizaron exclusivamente en los cultivos SEM, SEI y SMC y para el caso del isoelectroenfoque también se corrieron las muestras ribosomales procedentes de callos de embriones maduros.

Para realizar estas pruebas se requirió: 1) la separación de los componentes celulares en dos fracciones: fracción ribosomal y fracción posribosomal; 2) calcular el rendimiento ribosomal, 3) cuantificar las proteínas contenidas en la fracción posribosomal; 4) la preparación de geles de acrilamida para isoelectroenfoque (IEF); e) la tinción con plata de los geles de acrilamida y 5) la valoración de síntesis de proteínas *in vivo* de los cultivos durante la fase de crecimiento exponencial.

5.2.1 Obtención de las fracciones ribosomal y posribosomal

Se separaron las células de maíz del medio de cultivo centrifugando a 2 000 rpm durante 10 min; la pastilla se maceró con nitrógeno líquido hasta que quedó un polvo fino; sin dejar que se descongelara se homogeneizó con 5 ml de amortiguador de extracción (Tris HCl 20 mM pH 7.8, MgCl 5mM, KCl 20 mM, NaF 5mM, 2-mercaptoetanol 0.5%, Tritón X100 1%, sacarosa 0.25 M, β - glicerofosfato 80 mM y PMSF 1mM), se centrifugó a 13 500 rpm durante 35 minutos en una centrífuga Beckman J2-21 rotor JA-20. El sobrenadante se pasó a tubos de policarbonato, los cuales contenían 1 ml de colchón de sacarosa (sacarosa 0.5 M y KCl 0.5 M disueltos en el mismo amortiguador de extracción). Se centrifugó a 50 000 rpm a 4° C durante 3 1/2 horas en una ultracentrífuga Beckman rotor 75 Ti para sedimentar los ribosomas. Los ribosomas y el sobrenadante posribosomal se conservaron por separado a -70° C hasta que se realizó la

electroforesis en el caso de los ribosomas o la cuantificación de proteínas para el caso de la fracción posribosomal.

5.2.2 Rendimiento de ribosomas

Se resuspendieron los ribosomas en el mínimo volumen de amortiguador de muestra preparado con anfolinas con un pH entre 2.5 y 5 al 5.6%, disuelto en urea 9.5 M v/v; de la solución resultante se tomaron 5 μ l. y se suspendieron en 300 μ l de agua desionizada en una celda de cuarzo de 500 μ l y se leyó contra la muestra blanco o de referencia (agua desionizada), a una longitud de onda de 260 nm; la absorbancia registrada en unidades de densidad óptica (DO), se multiplicó por el factor de dilución (60x) para obtener el rendimiento total.

5.2.3 Cuantificación de proteínas en la fracción posribosomal

Las proteínas contenidas en el sobrenadante posribosomal (obtenido como se indicó anteriormente), fueron precipitadas con TCA (ácido tricloroacético) al 15 % final durante dos horas a 4°C, se centrifugó a 15 000 rpm durante 30 minutos, la pastilla obtenida se lavó con acetato de amonio 0.1 M en metanol y se centrifugó a 5000 rpm por 15 minutos, se tiró el sobrenadante y se dejaron evaporar los residuos de metanol a temperatura ambiente; se añadió agua desionizada para resuspender la pastilla usando hidróxido de potasio 5 M para reducir la acidez.

Para cuantificar las proteínas totales encontradas en el sobrenadante obtenido después de la extracción de ribosomas se usó la técnica establecida por Bradford utilizando albúmina sérica bovina como proteína de referencia.

5.2.4 Evaluación de la velocidad de síntesis de proteínas *in vivo*

Este experimento se realizó en cultivos SEM, SEI y SMC, después de 3 días de ser subcultivados (tiempo correspondiente a la fase exponencial temprana dentro de la curva de crecimiento previamente caracterizada), estos cultivos se concentraron diez veces centrifugando 5 minutos a 2 000 rpm para eliminar el medio de cultivo y sólo agregar el necesario para obtener un volumen final de 6 ml, los cuales fueron divididos en tres porciones de 2 ml cada una; estas porciones fueron contenidas en viales pequeños estériles y después marcados con 10 μ Ci de ^{35}S -Metionina (New England Nuclear, actividad específica 1175 Ci/mmol) durante 24 horas en agitación constante, después de las cuales se cosecharon las células de cada cultivo y se procedió a la extracción de proteínas siguiendo el mismo procedimiento que para la obtención de proteínas posribosomales hasta el punto en el que se resuspendió la pastilla de proteínas. En esta parte, se centrifugó nuevamente a 15 000 rpm 15 minutos se desechó el sobrenadante eliminando la marca residual que no fue incorporada por las células y se resuspendió en 100 μ l de agua, más 20 μ l de KOH 5 M; se tomaron 20 μ l de esta suspensión y se pasaron a viales con 5 ml de líquido de centelleo para contar por dos minutos la radiactividad incorporada en las proteínas sintetizadas en un contador de centelleo líquido Minaxi β de Packard.

5.2.5 Isoelectroenfoco para las PRAs

Se prepararon soluciones madre por separado de acrilamida al 30% y bisacrilamida al 1%, disolviéndolas en agua desionizada. Para un volumen final de 15 ml se añadieron 2.5 ml de acrilamida (quedó al 5.5%) y 3 ml de bisacrilamida (dejándola al 0.36 %), 7.2 g de urea y se disolvió en baño maría a 37° C, se agregaron 960 μ l de anfolinas de SIGMA pH 2.5-5, y se aforó con agua desionizada hasta 14.9 ml, finalmente se añadieron 45 μ l de

TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamino) y 75 μ l de persulfato de amonio (APS) al 10%; esta solución polimeriza en 2 $\frac{1}{2}$ minutos, por lo que fue necesario verterla en el aparato rápidamente, usando una pipeta pasteur y cuidando que no se formen burbujas. Todas las electroforesis se realizaron en cámaras verticales Hoefer Scientific SE 500.

Los ribosomas obtenidos en los cultivos callos de embriones maduros, SEM, SEI y del cultivo tratado con medio condicionado SMC, se colocaron en carriles diferentes de la placa del gel y en otro carril se colocaron los ribosomas obtenidos de ejes embrionarios germinados por 24 horas, como control. Se pusieron las muestras en una cantidad equivalente a 8 DO a 260 nm. Vertida la muestra se añadieron 10 μ l de urea 2 M y se cubrió el pozo con NaOH 0.03 M, misma solución que cubre la parte superior del aparato (cátodo), dejando al H₂SO₄ 0.1 M en la base del mismo (ánodo), para establecer el gradiente de pH. El gel se sometió a diferentes voltajes, iniciando la corrida con 50 V durante 15 minutos, se continuó a 100 V por 25 minutos seguidos de otros cambios de voltaje a 200, 300, 400, 500 y 600 V dejando 25 minutos entre un cambio y otro, después se bajó la intensidad hasta 250 V en la que se mantuvo durante 18 hrs, finalmente a 600 V durante 30 minutos. Considerando el voltaje al que se sometió el gel, éste debe ser lo más delgado posible (0.5 mm) para reducir la resistencia y así evitar el sobrecalentamiento.

5.2.5.1 Tinción con plata de los geles de IEF

Una vez terminada la corrida, el gel:

1. Se fijó con TCA al 10% una hora.
2. Se enjuagó con agua desionizada 5 minutos
3. Se sumergió en 100 ml de agua desionizada.

4. Se calentó por 0.5 minutos en horno microondas en "high" y se dejó en agitación suave durante 5 min, y se calentó dos veces, medio minuto cada vez, agitando 5 minutos entre una vez y otra.
5. Se retiró el agua y se añadió DTT (Ditiotreitol) 0.2 mM repitiendo el punto 4.
6. Se eliminó la solución anterior y se enjuagó con agua desionizada.
7. Se sumergió el gel en una solución de nitrato de plata (AgNO_3) al 0.1% y se repitieron los puntos 4 y 6.
8. Se puso en una solución de Na_2CO_3 al 3 % y formaldehído al 0.185 % vertiéndola poco a poco hasta lograr la tinción deseada de las bandas.
9. La reacción de tinción, se detuvo agregando ácido cítrico al 20 %.

V RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Consideraciones

La suspensión celular después de un subcultivo tiene una consistencia mucho más homogénea que el cultivo del cual proviene, ya que se separa del tejido madre, que corresponde al callo usado como inóculo, el cual queda como remanente, formando agregados celulares o llega a diferenciarse en raíces que pueden alterar los registros tomados de la suspensión celular. Dada la sensibilidad de los parámetros de crecimiento se hace necesario obtener una composición homogénea en los cultivos, es por ello que las evaluaciones correspondientes a los parámetros de crecimiento se tomaron después del primer subcultivo; por lo cual no se evaluó el comportamiento del cultivo durante el primer período de incubación (cultivo madre).

Entre los parámetros de crecimiento usados convencionalmente en cultivos de células en suspensión se encuentran el paquete celular (PC), el peso fresco (PF) y el peso seco (PS), los cuales son empleados en este trabajo para evaluar la respuesta a los diferentes tratamientos aplicados sobre los cultivos obtenidos por callos provenientes de embriones maduros de maíz.

El PC registra el volumen ocupado por las células en suspensión dentro de un volumen determinado de medio de cultivo y de esta manera permite distinguir los cambios ocurridos a este nivel durante el tiempo de incubación. Debe considerarse que un incremento en el volumen del paquete celular no significa necesariamente un incremento en la cantidad de células, pues el primero puede aumentar cuando las células incrementan su contenido de agua y por lo tanto su tamaño.

El PF refleja como el anterior, el comportamiento de los cultivos de células en suspensión, esta vez en unidades de peso; de la misma manera el contenido de agua en las células,

induce un incremento en los valores de PF que no necesariamente responde a un crecimiento en la población celular.

El PS es otro indicador de crecimiento que a diferencia de los anteriores, reporta las variaciones en la cantidad neta de masa celular del cultivo a través del tiempo, ya que las células se pesan deshidratadas. Sin embargo, las cantidades de masa celular registradas en este trabajo son tan pequeñas (del orden de mg), que aumenta la posibilidad de medir artefactos.

Las consideraciones hechas sobre los parámetros antes señalados apuntan la necesidad de basar en más de uno las observaciones y conclusiones que puedan obtenerse de cada tratamiento. De esta manera se refleja la respuesta de los cultivos celulares en suspensión, a las condiciones probadas durante el tiempo de incubación en curvas de crecimiento y/o en gráficas de incremento obtenidas por paquete celular, peso fresco y peso seco.

Cualquiera de estos parámetros puede ser usado como un parámetro confiable, si al cotejarlo con los resultados obtenidos por otros parámetros de crecimiento, regularmente se encuentra correspondencia en el comportamiento de la curva a través del tiempo.

Las curvas de crecimiento obtenidas para PC, PF y PS representan el promedio de tres repeticiones para cada punto de la curva. Cada muestra es tomada diariamente después del primer subcultivo para cada tratamiento. Para medir el paquete celular se tomaron muestras de 1 ml cada una; los parámetros PF y PS de dichas curvas se evaluaron con muestras de 2 ml cada una para cada tratamiento.

Las gráficas de crecimiento presentadas en forma de barras, comparan en todos los casos, el mínimo registro con los valores máximos alcanzados en PC, PF y/o PS en cada

tratamiento, señalando los tiempos en que estos eventos ocurren dentro de su respectiva curva de crecimiento. En estas gráficas se representan las desviaciones estándar obtenidas en tres repeticiones independientes.

2. Efecto de dos concentraciones de cinetina sobre el crecimiento celular

Se establecieron cultivos en suspensión inoculando el callo procedente de embriones maduros en medios de cultivo líquidos, con la finalidad de probar el efecto de la citocinina cinetina (KIN) a dos concentraciones (0.01 mg L^{-1} en KIN1 y 0.1 mg L^{-1} en KIN2), el resto de la composición de estos medios fue la misma. El tiempo de incubación de estos cultivos (cultivo madre y primer subcultivo) tuvo una duración de 8 días, después de los cuales se realizó el subcultivo en el primer caso y en el segundo se hicieron las evaluaciones de crecimiento por PC, PF y PS.

En la figura 1a, la curva de crecimiento obtenida por PC, muestra que la respuesta de los cultivos KIN2 supera notablemente a la reflejada por los cultivos de KIN1; ambos cultivos coinciden en el tiempo que tardan en alcanzar su máximo rendimiento, que es en el cuarto día después del primer subcultivo, seguido por un decaimiento en los valores de PC.

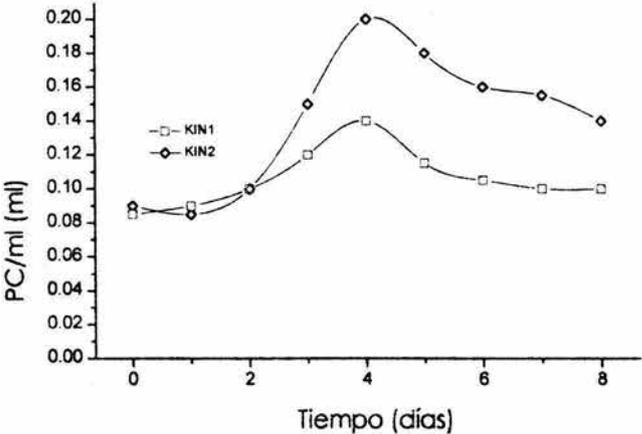


Figura 1a. Curva de crecimiento obtenida por paquete celular, después del primer subcultivo en cultivos de células en suspensión de maíz provenientes de callos de embriones maduros tratados con dos concentraciones de cinetina usando 0.01 mg L^{-1} (Kin1) y 0.1 mg L^{-1} (Kin2).

En la figura 1b se representan los valores de PC iniciales y se comparan con el máximo registro de crecimiento en cada tratamiento. Las líneas verticales representan la desviación estándar obtenida de tres repeticiones independientes. La diferencia inducida por el incremento en las concentraciones de KIN, en el caso de los cultivos KIN2 se registra un incremento en PC del 122%, con respecto al volumen celular inicial, el cual evidentemente supera al incremento ocurrido en los cultivos KIN1, que corresponde a un 41% sobre los registros iniciales.

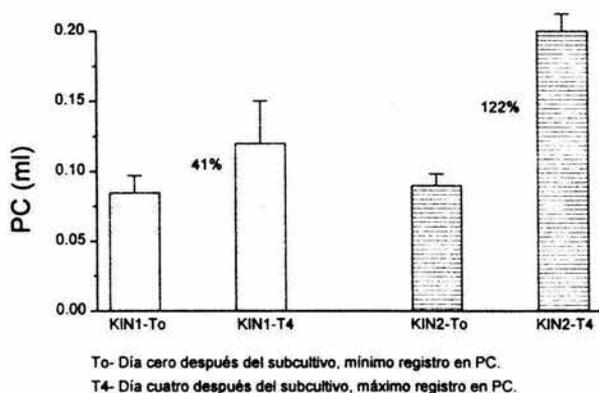


Figura 1b. Gráfica de paquete celular, que compara los puntos mínimos y los máximos presentados en cada tratamiento dentro su respectiva curva de crecimiento.

En la curva de crecimiento obtenida por PF (figura 2a), al igual que la obtenida por PC, señala al cultivo KIN2 como el de mayor crecimiento en relación con el KIN1, sin embargo, en esta ocasión los máximos rendimientos de los cultivos celulares se registran entre el segundo y cuarto día, para el primer subcultivo en KIN1, y entre el primero y el tercer día para el cultivo KIN2, esto sugiere una velocidad de crecimiento mayor en KIN2.

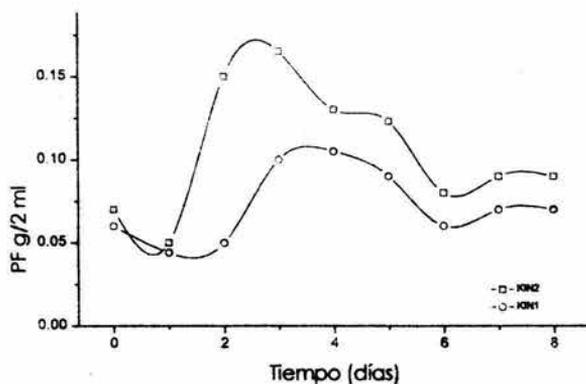


Figura 2a. Curva de crecimiento obtenida por peso fresco en los cultivos de células de maíz en suspensión tratados con cinetina a las concentraciones correspondientes a KIN1 (0.01 mg l^{-1}) y KIN2 (0.1 mg l^{-1}).

En la figura 2b se presentan diferencias tanto en el incremento que induce cada tratamiento como en el tiempo en que tardan en llegar al máximo, en el tratamiento KIN1 se alcanza el máximo rendimiento un día después que KIN2 y tiene un incremento del 111% sobre los registros iniciales, mientras que la respuesta de los cultivos tratados con una concentración de cinetina diez veces mayor (KIN2) registran un incremento del 200%, el cual es alcanzado al tercer día.

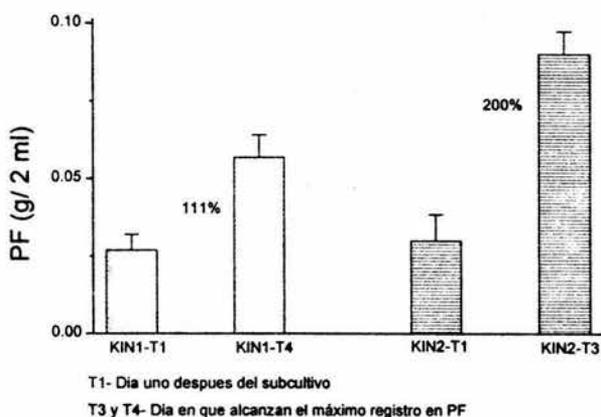


Figura 2b. Gráfica de peso fresco que representa el crecimiento de los cultivos desde los tiempos iniciales hasta los tiempos en que se alcanzan los máximos rendimientos en los tratamientos KIN1 y KIN2. Las líneas verticales corresponden a la desviación estándar de tres repeticiones independientes.

Las gráficas de PS (Figuras 3a y 3b), coinciden con las obtenidas por PC y PF en presentar al cultivo KIN2 con mayores registros que KIN1. El incremento en peso seco es bastante notable en estos cultivos, alcanzando los máximos valores en el cuarto día después del subcultivo en el caso de KIN2 y en el quinto día en el de KIN1. El incremento producido, con respecto al registro correspondiente a la densidad inicial de los cultivos KIN1 fue del 158%, el cual es nuevamente menor que el obtenido en los cultivos KIN2 los cuales produjeron un incremento del 200%.

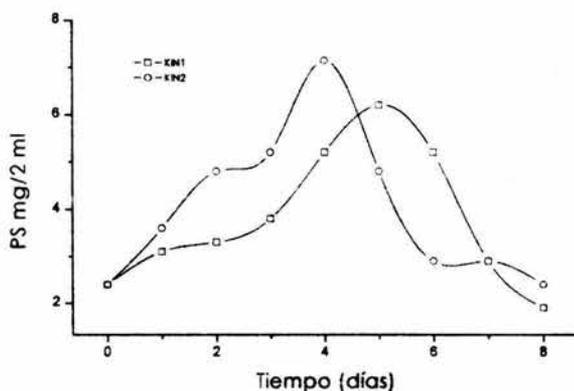


Figura 3a. Curva de crecimiento obtenida por peso seco en los cultivos celulares de maíz generados a partir de callos precedentes de embriones maduros tratados con cinetina a dos concentraciones 0.01 mg L^{-1} (KIN1) y 0.1 mg L^{-1} (KIN2).

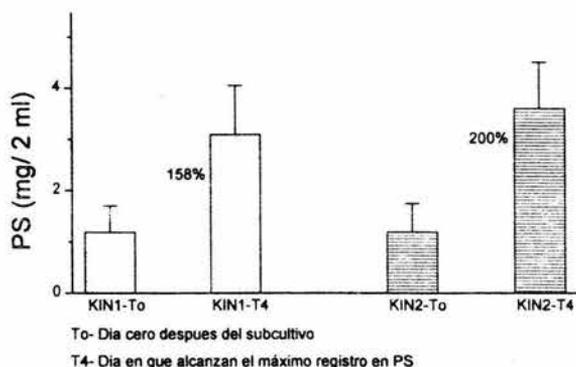


Figura 3b. Gráfica de peso seco registrado en los cultivos en suspensión tratados con cinetina a las concentraciones KIN1 y KIN2.

Al comparar el comportamiento de cada curva de crecimiento, se encuentra que el tiempo que corresponde al rendimiento máximo para las curvas obtenidas es el mismo en PC y PS en el tratamiento KIN2 y corresponde al cuarto día después del subcultivo (T4), en el tratamiento KIN1 el parámetro de peso seco está desfasado por un día con respecto al PC, llegando al máximo rendimiento en el T5 y no en T4 como ocurre en PC. El hecho de que los cultivos en suspensión KIN2 alcancen su máximo rendimiento en PC y PS simultáneamente, señala que el incremento registrado por PC corresponde a un mayor número de células y no a células más grandes como puede ser el caso. En la curva obtenida por PF los mayores registros se encuentran entre los tiempos 2 y 4, resaltando así, el desfase entre la gráfica obtenida por peso fresco con respecto a las obtenidas por PC y PS. El comportamiento del cultivo celular, evaluado por PC, PF y PS, muestra su máximo rendimiento entre el segundo y cuarto día, después de este tiempo se hace evidente el decaimiento en el crecimiento celular, sin pasar aparentemente, por una fase equivalente a la fase estacionaria; el repentino decaimiento de las curvas de crecimiento, puede interpretarse como la respuesta de los cultivos celulares al

agotamiento de los nutrientes que inicialmente se encontraban en el medio de cultivo. Estos cultivos fueron incubados durante 8 días sin renovar el medio de cultivo; en lo sucesivo el tiempo de incubación se redujo a 4 días.

A continuación se comparan las diferencias obtenidas por PS en el comportamiento de los cultivos KIN2 incubados por 8 días, con los cultivos incubados con el mismo tratamiento durante 4 días (KIN2.2).

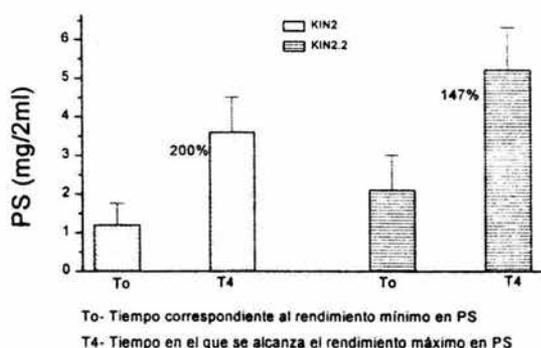


Figura 3c. Gráfica de crecimiento que compara las diferencias en rendimiento de PS entre los cultivos tratados con 0.1 mg L^{-1} de KIN incubados por 8 días (KIN2) y por 4 días (KIN2.2)

En principio, las diferencias entre la respuesta de los cultivos KIN1 y KIN2, recaen en el tamaño del inóculo inicial con el que cada uno de estos cultivos fue subcultivado, siendo menor en el cultivo KIN2 que en el KIN2.2. Esto puede ser una consecuencia del tiempo de incubación, ya que los cultivos KIN2 fueron subcultivados en una fase de decaimiento, cuando la división celular ha cesado y muy probablemente ha ocurrido muerte celular, mientras que los cultivos KIN2.2 fueron subcultivados en la fase exponencial en la que se da la división celular. En esta gráfica es evidente la diferencia entre el rendimiento

división celular. Se ha reportado que al aumentar la frecuencia de los subcultivos se estimula la síntesis de proteínas (Bevan y Northcote, 1981; Wang *et al.*, 1986); sin embargo, en diferentes trabajos, los sistemas en suspensión de maíz se mantienen sin subcultivar de una a dos semanas, inoculando callos embriogénicos de maíz (Green y Armstrong, 1983; Sellmer *et al.*, 1993). En todos los casos, las condiciones de incubación dependen de los objetivos que se persigan.

Los resultados obtenidos y representados en estas gráficas señalan al tratamiento KIN2 como el más productivo, lo que indica una respuesta favorable hacia el incremento en la concentración de cinetina. Esta tendencia, puede estar fundamentada por una parte, por que la actividad de esta citocinina es relativamente baja, con respecto a otras citocininas sintéticas como BA y 2ip. La concentración de cinetina usada en los medios de cultivo MS es la concentración mínima para producir una respuesta en el tejido blanco, y aún cuando la concentración de cinetina en el tratamiento KIN2, es diez veces mayor que la usada en el medio MS y en este caso KIN1, sigue siendo menor que la sugerida como la óptima para inducir la división celular (0.5 mg L^{-1}), de diferentes tejidos vegetales bajo condiciones de cultivo *in vitro* (Matsubara, 1990). Para determinar la composición de un medio que induzca la respuesta buscada de la mejor manera, las pruebas deben realizarse sobre las condiciones de cultivo de manera específica, ya que la respuesta del tejido puede variar considerablemente de una especie a otra (Pollard y Walker, 1990).

3. Efecto de las citocininas BA y 2ip sobre el crecimiento celular.

En esta parte se probó el efecto de dos tipos diferentes de citocininas, BA y 2ip, sobre el crecimiento de los cultivos celulares obtenidos por embriones maduros de maíz. Las citocininas BA y 2ip fueron aplicadas a una concentración de 0.1 mg L^{-1} . Buscando una mejor respuesta en el rendimiento de dichos cultivos también se probó el efecto de una fuente extra de nitrógeno, suplementando los medios de cultivo tratados con BA y con 2ip, con los aminoácidos del coctel 20, este coctel, sustituye a las vitaminas modificadas del medio MS (VMS*) y se compara la respuesta de los cultivos en presencia de VMS* o de coctel 20, (Ver apéndice Tabla 2).

De esta manera surgieron cuatro tratamientos diferentes, uno con BA y Coctel 20 (BA-C), un segundo con BA y VMS* (BA-VMS*), otro con 2ip y Coctel 20 (2ip-C) y por último 2ip con VMS* (2ip-VMS*). En estas pruebas se mantuvo la densidad inicial del cultivo madre inoculando 6 g de callo en 60 ml de medio de cultivo; el tiempo de incubación para el tejido madre tuvo una duración de cuatro días y el subcultivo fue evaluado también por cuatro días.

Con el fin de simplificar la información, en estos resultados se omiten las curvas de crecimiento y sólo se representan sus respectivas gráficas de crecimiento, en donde es posible comparar el incremento ocurrido en cada tratamiento desde sus registros iniciales, hasta los máximos rendimientos detectados por los parámetros PC, PF y PS. En cada caso se representan las desviaciones estándar de los resultados obtenidos en tres repeticiones independientes.

En la figura 4 queda representada la respuesta de los cultivos a cada tratamiento, y puede verse que en base al parámetro de crecimiento PC, la citocinina Zip presenta una tendencia a inducir un incremento mayor en el volumen celular en relación con BA, ya sea en presencia de vitaminas o de aminoácidos. También pueden distinguirse diferencias en la respuesta inducida por la misma citocinina, cuando se encuentra acompañada de VMS* o de Coctel 20. Las pruebas realizadas con Zip señalan que el incremento en paquete celular es relativamente mayor cuando está en un medio suplementado con vitaminas (VMS*), obteniendo un incremento del 75%, respecto a los registros obtenidos por PC en el tiempo cero, y sólo del 43% cuando actúa con el suplemento de aminoácidos (Coctel 20).

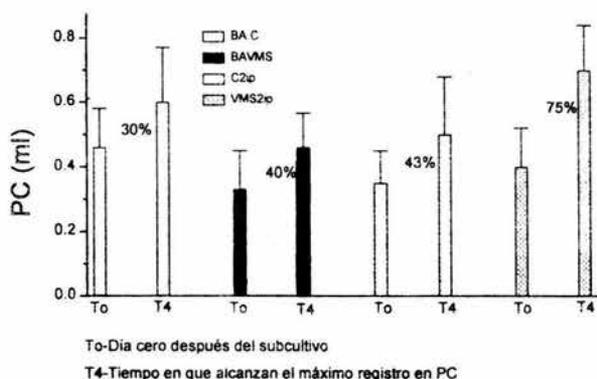


Figura 4. Gráfica de crecimiento en el paquete celular obtenido en los cultivos tratados con las citocininas BA y Zip suplementados con Coctel 20 (C) o con vitaminas (VMS*) comparando los registros iniciales (To) con máximos registros en paquete celular (T4).

En la figura 5 los mínimos registros se dieron dos días después del subcultivo, lo que indica un decremento en dichos valores desde el tiempo inicial (T₀) al T₂, (tiempo correspondiente a los registros mínimos en peso fresco). El rendimiento máximo en PF obtenido en los tratamientos de Zip señala nuevamente al cultivo Zip-VMS* como el que induce un mayor incremento en el PF celular, el cual alcanza un 57%, sin embargo, los cultivos tratados con Zip en presencia de aminoácidos (Zip-C), tienen un incremento ligeramente menor (20%), que el reflejado por los cultivos tratados con BA-C (31%), aunque el rendimiento neto entre estos cultivos es aproximado.

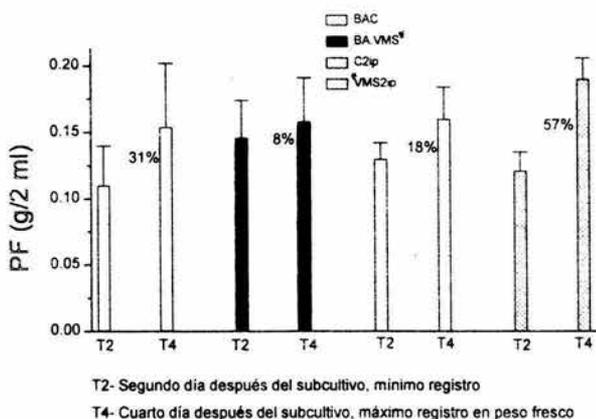


Figura 5. Gráfica de crecimiento en peso fresco de cultivos de células de maíz en suspensión tratados con BA y Zip en medios de cultivo suplementados con aminoácidos (C) o vitaminas (VMS*) en los tratamientos BA-C, BA-VMS*, Zip-C y Zip-VMS* comparando los mínimos y máximos registros.

En la figura 6 el rendimiento máximo en PS se registra en el cuarto día y nuevamente, el incremento inducido por el tratamiento 2ip-VMS* (212%), muestra una tendencia a superar a los tratamientos BA-C (184%), 2ip-C (158%) y BA-VMS* (130%). Ésta y la gráfica anterior, permiten reiterar la tendencia que presentan los cultivos tratados con BA a tener mayores incrementos en presencia de aminoácidos (C), que con vitaminas.

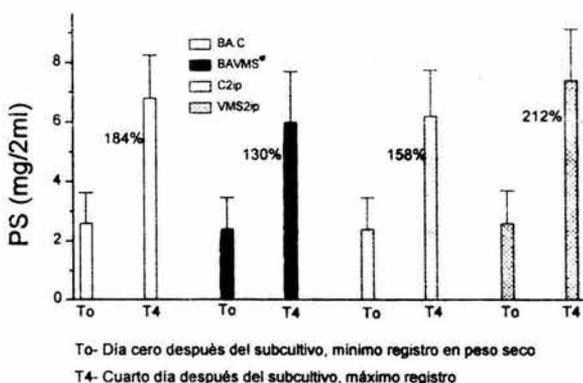


Figura 6. Gráfica de crecimiento en peso seco de los cultivos en las suspensiones celulares establecidas bajo las condiciones correspondientes a los tratamientos BA-C, BA-VMS*, 2ip-C y 2ip-VMS*.

En las gráficas presentadas para describir el comportamiento de los cultivos en respuesta a los tratamientos probados, el registro máximo en todos los parámetros se da en el cuarto día después del subcultivo, ubicando en dicho tiempo a la fase exponencial. Al comparar los mejores tratamientos para cada citocinina, puede verse que 2ip-VMS*, induce un incremento mayor en el crecimiento del cultivo celular cuando se

encuentra en presencia de las vitaminas (VMS*), ya que su respuesta es considerablemente inferior cuando Zip se encuentra acompañado del Coctel 20; de manera inversa, el tratamiento con BA y Coctel 20 (BA-C) resulta ligeramente mejor que con VMS*.

La diferente respuesta inducida por cada citocinina en presencia de los dos suplementos, Coctel 20 y VMS*, nos impide decidir de manera aislada, cual de éstos induce un incremento mayor, por lo que se elige de manera integral al tratamiento Zip-VMS* como el más productivo.

En las observaciones obtenidas de las pruebas realizadas a los cultivos de células en suspensión procedentes de callos de embriones maduros, puede verse cierta congruencia entre los incrementos producidos en PC y los producidos a nivel de PS, lo cual nos habla de células de un tamaño más o menos regular entre las poblaciones celulares de cada cultivo, pues en todos los casos, un incremento en el volumen celular se traduce en un incremento en la masa seca de las células. Los resultados obtenidos por PF, aún cuando muestran la misma tendencia que la observada por PC y PS en cada tratamiento, difiere de estos parámetros en presentar valores de incremento relativamente bajos con respecto a los obtenidos por PC. Se esperaba encontrar cierta correspondencia en el comportamiento reflejado por PC y por PF, ya que en ambos, casos son registros realizados a las células en condiciones hidratadas y que la diferencia entre estos parámetros son las unidades de medición. Por otra parte, en PF se registra un decremento en el rendimiento celular, desde los valores iniciales (T_0) hasta el segundo día (T_2), después del subcultivo; esta situación no se ve reproducida por PC o por PS. Las irregularidades encontradas en los registros de peso fresco pueden ser justificadas al considerar que, son datos tomados después de filtrar la muestra de la suspensión celular y que el peso del papel filtro varía por la hidratación producida por el medio de cultivo, y después, por la rápida deshidratación del mismo papel, al ser expuesto a la intemperie a intervalos irregulares de tiempo; estas deficiencias nos impiden considerar estos datos

como resultados confiables, por lo que en esta discusión, tendrán más peso los obtenidos por PC y PS.

Los resultados observados por los tratamientos probados sobre las suspensiones celulares de maíz, fueron descritos en base su rendimiento y al incremento porcentual respecto a los registros iniciales obtenidos por PC, PF y PS. En la Tabla A pueden compararse las respuestas, en incremento, de los cultivos a cada tratamiento. Se comparan exclusivamente los mejores tratamientos obtenidos por cada citocinina.

	KIN2.2	BA-C	BaVMS*	2ip-C	2ip-VMS*
PC	90%	30%	40%	43%	75%
PF	180	31%	8%	20%	57%
PS	200%	184%	130%	158%	212%

Tabla A. Comparación integral de los incrementos porcentuales registrados por PC, PF y PS en los diferentes tratamientos de citocininas probados sobre las suspensiones celulares de maíz.

En esta tabla se ve más claramente el efecto que produjo cada tratamiento sobre el incremento celular, medido por los parámetros de PC, PF y PS. Aquí puede notarse que los mayores incrementos se presentaron en los cultivos tratados con el tratamiento KIN2.2 (KIN 0.1 mg L⁻¹ subcultivados en la fase exponencial, T4) y en el tratamiento 2ip-VMS*, sin embargo, al contrastar estos resultados con el rendimiento (figura 6a), puede verse que la respuesta inducida por la cinetina es considerablemente menor que la inducida por el resto de los tratamientos probados.

En la figura 6a se representan las diferencias inducidas por cada citocinina en el crecimiento de los cultivos celulares obtenidos por embriones maduros de maíz.

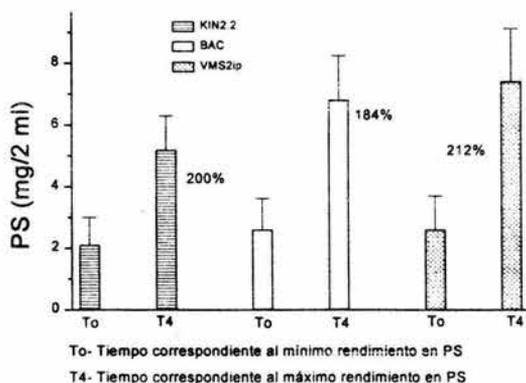


Figura 6a. Gráfica de peso seco de los cultivos tratados con cinetina a 0.1 mg L⁻¹ incubados por 4 días (KIN2.2) comparados con el incremento producido por los tratamientos BA-C y 2ip-VMS*.

En esta gráfica se condensa la información obtenida por cada tratamiento probado en la búsqueda de optimizar la composición del medio de cultivo, en el sentido de incrementar el rendimiento celular de los cultivos en suspensión obtenidos por embriones de maíz maduros. Aquí se hace evidente que el tratamiento que tiende a inducir un mayor crecimiento celular es el 2ip-VMS*.

Estas pruebas nos permitieron evaluar el efecto de otras dos citocininas como Ba y 2ip (a una concentración de 0.1 mg L⁻¹), en presencia de los suplementos de vitaminas (VMS*) o aminoácidos (Coctei 20), y encontrar que la respuesta de los cultivos (en crecimiento), a estos fitorreguladores no es independiente de la composición del medio de cultivo.

Al comparar los tratamientos probados con citocininas de diferente naturaleza, es posible encontrar que la velocidad de crecimiento de los cultivos puede estar modulada por el tipo de regulador de crecimiento que se aplique y que estos reguladores, aun siendo de la misma categoría (citocininas, en este caso), pueden inducir diferentes repuestas en el cultivo celular. Estos resultados son congruentes a lo reportado por Matsubara (1990), donde se señala a las citocininas BA y 2ip con una actividad mayor sobre la división celular, en relación con la presente en la cinetina. Por otra parte es importante destacar que la actividad de estos fitorreguladores se ve afectada por la presencia de las diferentes entidades químicas contenidas en los suplementos de vitaminas (VMS*) y/o aminoácidos (Coctel 20), ya que tanto BA como 2ip responden de manera diferente en presencia de uno o de otro suplemento. Se desconoce a qué nivel se da la interacción de estos componentes con los fitorreguladores probados.

Por otra parte, estos resultados nos han permitido valorar, en primera instancia, el comportamiento a través del tiempo de las células en suspensión establecidas bajo condiciones *in vitro*. También pudo comprobarse que la fase de crecimiento en la que se encuentran las células al ser subcultivadas es un factor importante para obtener cultivos con un mayor rendimiento celular.

4 Efecto del medio condicionado sobre el crecimiento de los cultivos de maíz en suspensión

En este apartado, se evaluó el efecto del medio condicionado (MC), extraído del cultivo obtenido al inocular los callos de embriones inmaduros (CEI) en suspensión (SEI), sobre los cultivos obtenidos por callos de embriones maduros (CEM) en suspensión (SEM). Ambos cultivos fueron establecidos y subcultivados en el medio de cultivo 2ip-VMS*. El cultivo SEM tratado con el medio condicionado (SMC), fue establecido en el medio 2ip-VMS* y subcultivado con el MC y el medio de cultivo 2ip-VMS*, en una proporción de uno a uno. La densidad inicial de los cultivos madre se mantiene para los cultivos SEM (6g /60 ml), pero en el caso de los cultivos SEI esta densidad se redujo a 4 g de callo por 60 ml de medio de cultivo, pues la velocidad de crecimiento de estos cultivos es más alta y de otra manera no nos permitiría el seguimiento de estos tratamientos de manera simultánea. Los datos, como anteriormente, corresponden a la suspensión celular después de ser subcultivada por primera vez y son tomados diariamente. El tiempo de incubación del cultivo madre también es de 4 días.

La respuesta de los cultivos SEM al MC fue evaluada en crecimiento por los parámetros de crecimiento PC, PF y PS, de los cuales sólo se presenta la gráfica de crecimiento obtenida por PS, cuyo comportamiento reproduce el presentado por PC y PF. El efecto de este medio condicionado sobre la maquinaria de síntesis fue evaluado por el contenido de proteínas en la fracción posribosomal, la velocidad de síntesis de proteínas, el rendimiento ribosomal y el contenido de proteínas ribosomales ácidas. Estas evaluaciones son realizadas en los tratamientos que incluyen a los cultivos en suspensión SEM, SEI y SMC, para comparar la situación de un cultivo de rápido crecimiento (SEI),

con un cultivo de lento crecimiento (SEM) y así poder inferir sobre el efecto del medio condicionado en los cultivos SMC.

Es importante destacar que en este trabajo no se trató de encontrar las condiciones óptimas para el crecimiento de los cultivos en suspensión establecidos a partir de callos de embriones inmaduros, y que las condiciones de incubación a las que fueron sometidas dichos cultivos, son las mismas que las elegidas para los cultivos establecidos por callos de embriones maduros con el fin de comparar ambos cultivos celulares a nivel bioquímico. Cabe señalar que trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, han logrado cultivos de células en suspensión a partir de callos de embriones inmaduros, con un rendimiento considerablemente mayor al presentado en este trabajo.

A continuación se presentan los resultados obtenidos durante el seguimiento de los cultivos SEM, SEI y SMC, después de ser subcultivados, con el fin de caracterizar su comportamiento, en crecimiento, a través del tiempo.

En la figura 7 se presenta la gráfica de crecimiento obtenida por PS de los cultivos SEM, SEI y SMC, cuyo comportamiento muestra las tendencias también observadas en PC y PF de estos cultivos.

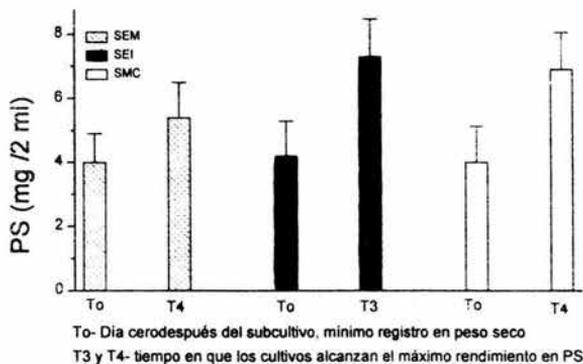


Figura 7. Gráfica de crecimiento en peso seco de los cultivos SEM, SEI SMC comparando los registros del tiempo inicial (To) con el máximo registro (T3 o T4 según sea el caso)

En esta gráfica están representadas las diferencias en cuanto al incremento en el PS de los cultivos SEM, SEI y SMC, mostrando cierta superioridad en el cultivo SEI en relación con SEM y SMC, puede verse que SEI presenta una velocidad de crecimiento más alta, ya que alcanza el rendimiento máximo en el día 3 y no en el 4 como SEM y SMC, por otra parte, puede verse una tendencia por este cultivo a tener un mayor rendimiento en PS. También puede verse una diferencia entre el incremento producido por SMC comparada con el generado por SEM, presentando el primero un rendimiento y un incremento mayor que el segundo. Tomando en cuenta que la naturaleza de los cultivos SMC y SEM es la misma (a partir de callos de embriones maduros), y que la única diferencia entre estos cultivos es la presencia del medio condicionado, extraído de los cultivos SEI, se sugiere

que es este acondicionamiento del medio el que puede favorecer el crecimiento de estos cultivos. Esto confirma que el medio de cultivo en el que han crecido células con una velocidad relativamente acelerada, puede estimular el crecimiento de cultivos de bajo rendimiento (Bellincampi y Morpurgo, 1987; Pollard y Walker, 1990).

5 Efecto del medio condicionado sobre algunas características del aparato traductor

Una vez establecidos los cultivos en suspensión SEM, SEI y SMC y ubicado su fase exponencial, estos tratamientos fueron reproducidos y mantenidos en las mismas condiciones durante tres días después del primer subcultivo (tiempo correspondiente a la fase exponencial temprana), después de los cuales se cosecharon las células. Éstas células fueron separadas, en dos fracciones, una ribosomal y otra posribosomal; la primera analizada por electroforesis, no sin antes medir su rendimiento, y la segunda utilizada para medir el contenido de proteínas en dicha fracción.

5.1 Rendimiento ribosomal

Los ribosomas obtenidos de 3 g de células procedentes de los cultivos en suspensión SEM, SEI y SMC, fueron resuspendidos en 300 μ l de amortiguador de carga (ver metodología) y se determinó la absorbancia de una alícuota de 5 μ l a 260 nm. El resultado en unidades de densidad óptica (DO) fue multiplicado por el factor de dilución (60x) para obtener el rendimiento total. Cada uno de los valores reportados corresponden a la media de tres repeticiones.

En la figura 8 se muestra una clara superioridad en el contenido de ribosomas del cultivo que ha mostrado un crecimiento más activo, el SEI. El cultivo SMC en presenta un rendimiento de ribosomas es ligeramente mayor que en el cultivo SEM (ambos procedentes de callos de embriones maduros), apuntando nuevamente a la presencia del medio condicionado como el posible causante de dichas diferencias.

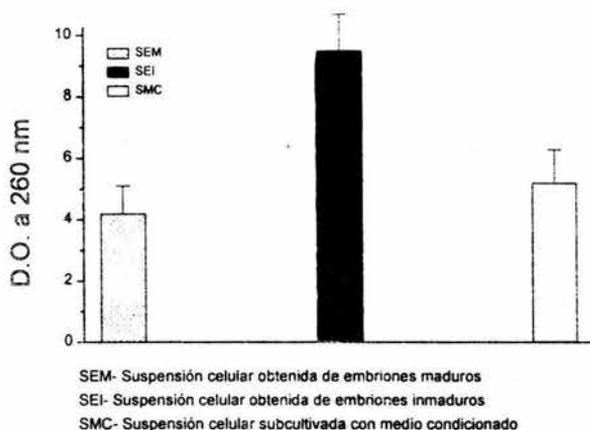


Figura 8. Rendimiento ribosomal calculado en 3 g de peso fresco de células obtenidas en los cultivos en suspensión SEM, SEI y SMC detenidas en la fase exponencial temprana ubicada en el tercer día después del primer subcultivo.

El rendimiento ribosomal es un parámetro asociado a la síntesis de proteínas, y es un indicador de la eficiencia de dicho proceso ya que se encuentra una relación directa entre la cantidad de ribosomas y la velocidad de síntesis (Lewin, 1993).

5.2 Contenido de proteínas en la fracción posribosomal

La fracción posribosomal obtenida después de la extracción de ribosomas, contiene todas las proteínas celulares excepto las ribosomales. La cuantificación de proteínas se realizó siguiendo la técnica de Bradford y los resultados están presentados en mg de proteína calculados siguiendo el patrón de la curva obtenida con suero de albúmina bovina (curva patrón), para el total de proteínas contenidas en la fracción posribosomal, obtenida de 3 g de peso fresco de células en suspensión.

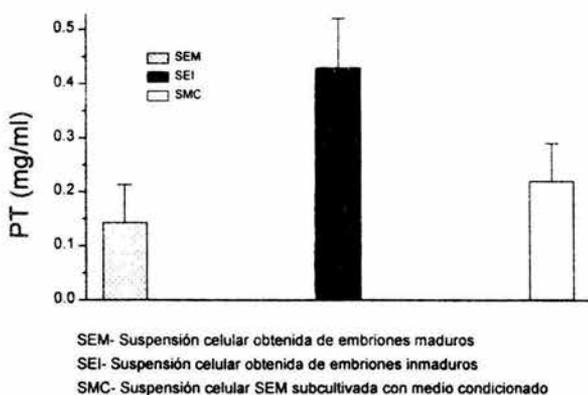


Figura 9. Contenido de proteínas (PT) cuantificadas por Bradford (585 nm de absorbancia) en la fracción posribosomal de tres gramos de peso fresco de células obtenidas en la fase exponencial en los cultivos SEM, SEI y SMC.

El contenido de proteínas es considerado como un parámetro de crecimiento, dada la directa relación entre la cantidad de células y el contenido de proteínas (Dixon, 1985). Los resultados obtenidos en esta prueba, nos permiten reiterar las tendencias observadas en los cultivos SEM, SEI y SMC, ya que puede verse que el comportamiento de estos cultivos se mantiene, en el sentido de que SEI presenta un contenido de

proteínas considerablemente mayor que SEM y que este a su vez se ve rebasado por el presente en SMC. Estas diferencias nuevamente se ven afectadas por la naturaleza del inóculo, y por la presencia del medio condicionado.

5.3 Síntesis de proteínas durante la fase exponencial de los cultivos celulares de maíz EM, EI y MC

Esta prueba se realizó, de igual manera, con células obtenidas en los cultivos en suspensión SEM, SEI y SMC, esta vez los 60 ml de cada cultivo, fueron reducidos a un volumen final de 5 ml, en el tiempo correspondiente a la fase exponencial temprana (T3), y mantenidos bajo condiciones *in vitro*. Cada cultivo fue marcado con 10 mCi de ^{35}S -Met durante 24 h, después de las cuales se cosecharon las células y se procedió a hacer la extracción de proteínas, para cuantificar la cantidad de ^{35}S -Met incorporada. Se usó un contador de centelleo líquido, leyendo cada muestra durante 2 minutos. A continuación se presenta de manera gráfica las cuentas por minuto (CPM), calculadas para el total de proteínas contenidas en el extracto de 2.5 ml de volumen celular.

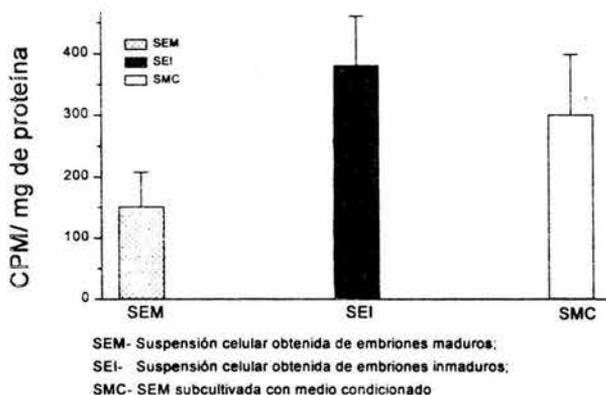


Figura 10. Síntesis *in vivo* de proteínas evaluada por la cantidad de ^{35}S -Met incorporada durante la fase exponencial temprana de los cultivos SEM, SEI y SMC.

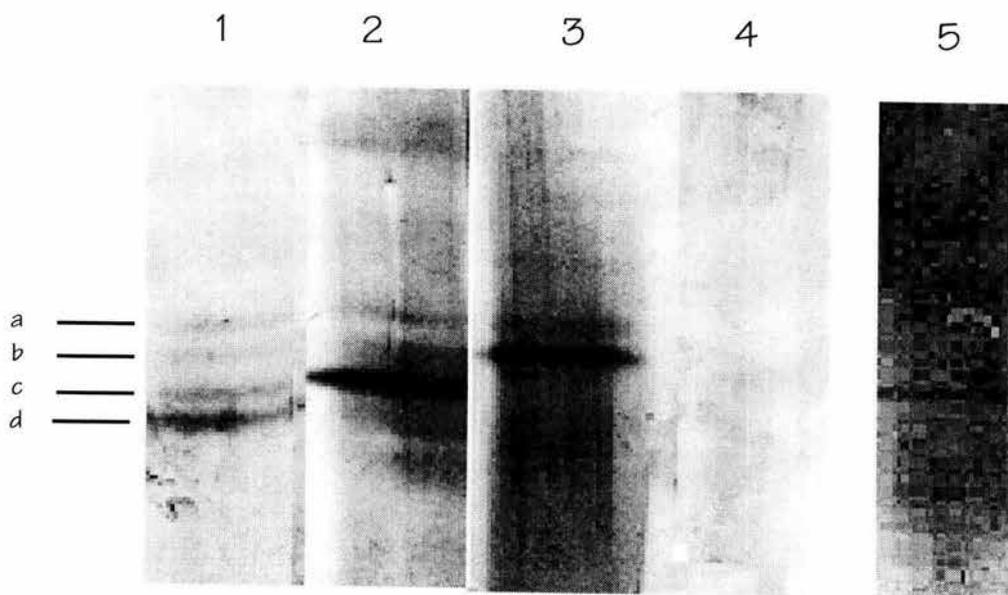
En la figura 10 se muestra que la cantidad de ^{35}S -Met incorporada por el cultivo celular SEI es superior que la que se detecta en SMC, y que éste último cultivo, tiende a incorporar una cantidad mayor de ^{35}S -Met que SEM. Estos resultados son una evidencia más en favor de que la eficiencia de la maquinaria de síntesis está determinado por la procedencia de las células establecidas en suspensión, siendo invariablemente mayor en los cultivos que provienen de embriones inmaduros con respecto a los generados por embriones maduros y que este último, puede tener un incremento en la velocidad de síntesis de proteínas si se encuentra en un medio acondicionado por el medio de cultivo extraído de los cultivos SEI.

5.4 Isoelectroenfoque de las proteínas ribosomales ácidas (PRAs)

Las pruebas anteriores, reflejan, de alguna manera la eficiencia de la maquinaria de síntesis de proteínas en cada cultivo; al respecto las pruebas hechas por isoelectroenfoque a las proteínas ribosomales ácidas aportan más información en cuanto a la condición de dicha maquinaria.

En estas pruebas, los ribosomas extraídos, fueron sometidos a análisis de isoelectroenfoque (IEF), aplicando muestras con un equivalente de 8 unidades de Densidad Óptica (DO) a 260 nm, en geles de acrilamida en el que el gradiente de pH se encuentra entre 2.5 y 5, para detectar a las PRAs cuyo punto isoeléctrico se encuentra entre 3 y 4. Esta prueba se realizó con ribosomas procedentes de células de SEM, SEI y SMC y se usaron como control, ribosomas de ejes embrionarios (EE) de maíz (raza Chalqueño), imbibidos 24 h, así como ribosomas extraídos de callos de embriones maduros e inmaduros de maíz .

En la lámina 6 se muestran las proteínas ribosomales ácidas en forma de bandas, detectadas por su punto isoeléctrico en la electroforesis realizada a muestras ribosomales, obtenidas de los cultivos mencionados.



1. Muestra ribosomal de EE. 2. Muestra ribosomal de CEI. 3. Muestra ribosomal de CEM. 4. Muestra ribosomal de SEM. 5. Muestra ribosomal de SMC

Lámina 5. Isoelectroenfoque sensible a proteínas ribosomales ácidas contenidas en diferentes cultivos celulares SEM, SEI y SMC.

En la lámina 1 se hacen visibles las diferentes bandas correspondientes a las proteínas ácidas ribosomales (PRAs). En el carril 1, correspondiente a la muestra ribosomal obtenida de ejes embrionarios (EE) germinados 24 horas, se pueden distinguir cuatro bandas, de las que a y b son las PRAs P1 y P2, respectivamente, en su forma no fosforilada, las bandas correspondientes a las letras c y d son las mismas proteínas P1

y P2 en este caso fosforiladas, lo que les confiere un punto isoeléctrico más ácido. La intensidad de las bandas C y d habla de una mayor cantidad de las proteínas P1 y y más aún de P2 en su forma fosforilada. En el carril 2, correspondiente a la muestra ribosomal obtenida de callos generados por embriones inmaduros de maíz, también pueden distinguirse las cuatro bandas a, b, C y d, detectadas en el control (EE), sin embargo la banda C en esta muestra aparece muy intensa, lo que puede interpretarse como una mayor cantidad de la proteína P1 fosforilada. En el carril 3, correspondiente a las proteínas ribosomales ácidas contenidas en los cultivos de callo de embriones maduros, se distinguen dos bandas, correspondientes a las bandas a y b, aun que en este caso la intensidad de éstas es mayor en relación con las vistas en CEI y más aún que las que se distinguen en EE, lo cual quiere decir que las proteínas P1 y P2 se encuentran más abundantes en los cultivos de callos generados por embriones maduros (CEM), y de estas proteínas, es la P2 la que se ve todavía con mayor intensidad, sin embargo, en estos cultivos no se distinguen las formas fosforiladas de las proteínas ribosomales ácidas. En el carril 4 se corrieron los ribosomas obtenidos de los cultivos SEM (obtenidos con callos CEM en suspensión), en los que la concentración de proteínas ribosomales ácidas es tan baja que no puede ser detectada por este sistema, dada la baja resolución de la impresión mostrada en esta lámina, no pueden distinguirse un par de bandas extremadamente tenues que corresponderían a las proteínas P1 y P2. En las muestras ribosomales obtenidas de los cultivos tratados con medio condicionado (SMC), se pueden distinguir dos bandas correspondientes a C y d, siendo la primera más intensa que la segunda, lo que quiere decir que P2 es más abundante en su forma no fosforilada que en estado fosforilado. Este último carril fue obtenido en otra electroforesis, en el que éstas bandas tenían la correspondencia mencionada con respecto al control. La muestra ribosomal obtenida en los cultivos en suspensión SEI, presentaron dos bandas intensamente expresadas, probablemente correspondientes a la proteína P2 y P2 fosforilada, sin embargo, su posición con respecto al control no

reproduce la situación típicamente encontrada en las PRA's de maíz, por lo que consideramos que éste resultado debe ser reproducido, lo que si podemos afirmar es la presencia y la abundancia de esta (s) proteína (s), en los cultivos SEI.

Es interesante contrastar que las PRA's P1 y P2, se encuentran presentes en los callos de embriones maduros, que son lo suficientemente abundantes para ser detectadas por este sistema y que es en el sistema en suspensión donde se ven considerablemente disminuidas. La diferencia entre los sistemas de cultivos de callo o de células en suspensión, se manifiesta a diversos niveles, el medio líquido mantiene a las células disgregadas, lo que reduce la proximidad entre una célula y otra, incluyendo a las células nodrizas, esto disminuye la actividad de los metabolitos producidos por las nodrizas sobre otras células. En los medios sólidos, las células se encuentran formando una masa amorfa de tejido, en la cual los metabolitos de las células nodrizas alcanzan rápidamente a las células aledañas estimulando su división y las funciones biosintéticas que preceden a éste proceso. Las diferencias en cuanto al contenido y naturaleza de las PRA's, también pudo verse entre los cultivos obtenidos por embriones inmaduros CEI (callo) y SEI (suspensión), donde en el primer caso (carril2), se distinguen las cuatro bandas, es decir se encuentra las proteínas P1 y P2, ambos péptidos en estado no fosforilado y fosforilado; en la suspensión obtenida de estos callos (SEI), solamente se distinguieron dos bandas. Estos resultados reflejan la importancia de las condiciones físicas en la que crecen los cultivos celulares, específicamente de la consistencia de los medios de cultivo.

Las observaciones obtenidas a partir de los cultivos SEI, han señalado invariablemente la superioridad de éstos en el crecimiento (figura 7), en el rendimiento ribosomal (figura 8) en el contenido de proteínas (figura 9) y en la velocidad de síntesis de proteínas (figura 10), con respecto a los cultivos SEM y SMC, lo cual puede vincularse con la presencia de las PRAs en estos cultivos y con su grado de fosforilación, modificación que incrementa la afinidad de estos péptidos por el ribosoma en el proceso de síntesis de proteínas (Saenz-Robles *et al.*, 1990).

Considerando que las condiciones de incubación no son las más favorables para el establecimiento de cultivos en suspensión obtenidos por callos de embriones inmaduros (SEI) y que la densidad inicial de su respectivo cultivo madre fue del 60% de la utilizada en los cultivos SEM, la respuesta de los cultivos SEI es aun mejor que los cultivos SEM.

De manera inversa, el comportamiento observado en los cultivos SEM, ha mostrado un lento crecimiento, así como un bajo rendimiento ribosomal y una velocidad de síntesis de proteínas considerablemente inferior con respecto a los cultivos SEI, fenómenos que son congruentes con la escasa la presencia de PRAs.

La adición de un medio condicionado obtenido de un cultivo de alto rendimiento como SEI, a un cultivo de lento crecimiento como SEM, ha mostrado una respuesta favorable a nivel de crecimiento, de rendimiento ribosomal y en la velocidad de síntesis de proteínas, comportamiento que puede estar relacionado con el incremento en la presencia de PRAs, las cuales se hicieron presentes en la electroforesis en su forma fosforilada. Esto sugiere un importante efecto del medio condicionado no sólo sobre el crecimiento celular sino también respecto a la eficiencia de la maquinaria de síntesis.

A pesar de que las PRAs no son el factor más limitante en el proceso de síntesis de proteínas, ya que al parecer estos se encuentran principalmente a nivel de iniciación (Hershey, 1991), los resultados aquí obtenidos permiten interpretar la función de las

PRA's en el crecimiento de los cultivos en suspensión. Debido a que la eficiencia de los ribosomas está relacionada con la presencia de PRA's (Ballesta y Remacha, 1996), puede decirse que los ribosomas provenientes de cultivos de lento crecimiento, como lo es el cultivo SEM, presentan relativamente pocas PRA's asociadas a sus ribosomas. Aun cuando los principales mecanismos de regulación en el proceso de traducción se encuentran en la fase de iniciación, se ha demostrado que la participación de las PRA's durante la elongación, incrementa considerablemente la velocidad de síntesis (Ballesta y Remacha, 1996); los resultados obtenidos en cuanto a la velocidad de síntesis de proteínas, coinciden con lo anterior pues los cultivos SEM tienen una velocidad de síntesis de proteínas relativamente baja, al igual que el contenido de PRA's en sus ribosomas.

Es interesante notar que estas deficiencias, pueden ser "reparadas" de alguna manera, por la aplicación del medio condicionado obtenido de SEI (SMC), y que la presencia de este medio condicionado en el cultivo, estimula su crecimiento y su velocidad de síntesis, sucesos probablemente relacionados con la presencia de PRA's en sus ribosomas.

Las observaciones realizadas entre los cultivos SEM, SEI y SMC hicieron posible detectar que la eficiencia de la maquinaria de síntesis de proteínas es un factor asociado directamente con la velocidad de crecimiento. esto se confirma al comparar el rendimiento ribosomal, el contenido de proteínas así como la velocidad de síntesis de proteínas entre los tres cultivos.

VI CONCLUSIONES

1. Entre los medios de cultivo probados, el que indujo un mayor crecimiento en las suspensiones celulares de maíz generados a partir de callos de embriones maduros (SEM), fue el correspondiente a 2ip-VMS*, aplicando la citocinina 2ip a una concentración de 0.1 mg L^{-1} y suplementado con las vitaminas del medio MS.
2. El tiempo que tardan las células en suspensión de los cultivos SEM en alcanzar un crecimiento exponencial es de 4 días.
3. El crecimiento de los cultivos SEM es incrementado por la aplicación del medio condicionado procedente de cultivos en suspensión generados por callos de embriones inmaduros de maíz.
4. El crecimiento de los cultivos SEM está relacionado con la velocidad de síntesis de proteínas.
5. La eficiencia de la maquinaria de síntesis de proteínas está relacionada con el contenido de ribosomas y de proteínas ribosomales ácidas asociadas a estas macromoléculas.

VII LITERATURA
CONSULTADA

1. Abel S, Oeller P, Theologis A. 1994. Early Auxin-Induced Genes Encode Short-Lived Nuclear Proteins. Proc Natl Acad Sci USA 91: 326-330
2. Armstrong C, and Green C. 1985. Establishment and Maintenance of Friable, Embryogenic Maize Callus and the Involvement of L-Proline. Planta. 164: 207-214.
3. Ballesta J, Remacha M, Nar and a T, Santos C, Bermejo B, Jiménez-Díaz A, and Ortiz-Reyes B. 1993. The Acidic Ribosomal Proteins and the Control of Protein Synthesis in Yeast. In Protein Synthesis and Targeting in Yeast, NATO ASI Series, Vol H 71. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
4. Ballesta J. and Remacha M. 1996. The Large Ribosomal Subunit Stalk as a Regulatory Element of the Eukaryotic Translational Machinery. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology Vol. 55
5. Balandrin F, Klocke S, Wurtele E and Bollinger H. 1985. Natural Plant Chemicals: Source of Industrial and Medical Materials. Science 228: 1154-1160.
6. Baulcombe D. and Key J. 1980. Polyadenylated RNA Sequences which are Reduced in Concentration Following Treatment of Soybean Hypocotils. J.Biol. Chem. 255: 8907-8913.
7. Bellincampi D. and Morpurgo G. 1987. Conditioning Factor Affecting growth in Plant Cells in Culture. Plant Science 51: 83-91
8. Berlin J. 1986. Secondary Products from Plant Cell Cultures. In Biotechnology. Microbial Products II. Eds. Rehm, J and Reed G. Verlagsangabe Wienheim, Alemania, 629-658 pp.
9. Bermejo B, Remacha M, Ortiz-Reyes B, Cruz S, and Ballesta J. 1994. Effect of Acidic Ribosomal Phosphoprotein mRNA 5'-Untranslated Region on Gene Expression and Protein Accumulation. Journal of Biological Chemistry. 269: 3968-3975.
10. Bevan M, and Northcote D. 1981. Subculture induced Protein Synthesis in Tissue Cultures of Glycine max and Phaseolus vulgaris. Planta 152: 24-31
11. Bewley J, and Black M. 1994. Seeds & Physiology Of Development and Germination. Plenum N.Y. ISBN 0-306-41687-5.

12. Brown T. 1990. Initiation and Maintenance of Callus Cultures. in Plant Cell and Tissue Culture. Methods in Molecular Biology, Vol 6. Humana Press. New Jersey 56-63 pp.
13. Bonga J and Von Anderkas P. 1991. In vitro Culture of Trees. Kluwer Academic Publishers. NY 97-101 pp.
14. Bonnie W. Fletcher J and Russell S. 1992. Quantification of Organelle Changes in Plant Suspension Cultures During Growth. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 31: 37-46
15. Chang Y. 1983. Plant Regeneration in vitro from Leaf Tissues Derived from Cultured Immature Embryos of Zea mays L. Plant Cell Reports. 2: 183-185.
16. Cleland R. 1976. Kinetics of Hormone-Induced H⁺ Excretion. Plant Physiol. 58: 210-213 pp.
17. Cleland R and Rayle, B. 1978. Auxin H⁺ Excretion and Cell Elongation. Bot. Mag Tokyo Special Issue 1:125-139 pp.
18. Cleland, R. 1988. Auxin and Cell Elongation. En Plant Hormones and Their Roles in Plant Growth and Development. Ed. Davies, J. Kluwer Academic Publishers. 132-148 pp.
19. Dahlberg, 1989. The Functional Role of Ribosomal RNA in Protein Synthesis. Cell. 57: 525-529.
20. Davies, J. 1988. The Plant Hormones: Their Nature, Occurrence, and Functions. In Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development. Kluwer Academic Publishers. Boston. 1-11 pp.
21. Darnell J. Lodish H. Baltimore D. 1990. Molecular Cell Biology. Sci. Am. Books. 154 pp.
22. Devlin R. 1987. Fisiología Vegetal. De OMEGA. Barcelona 517 pp.
23. Dodds, T & Roberts, L. 1982. Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge Univ. Press, N.Y. 107-127 pp.
24. Dolezelová M, Dolezel J & Nesticky M. 1992. Relationship of Embryogenic Competence in Maize (Zea mays L.) Leaves to Mitotic Activity, Cell Cycle and Nuclear DNA Content. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 31: 215-221
25. Droog, F. Hooykaas, P. Libbenga, K and van der Zaai, E. 1993. Proteins Encoded by an Auxin-Regulated Gene Family of Tobacco Share Limited but Significant Homology with

- Glutathione-S-Transferase and one Member Indeed Shows in vitro GST Activity.
Plant Mol Biol. 21: 965-972.
26. Esau, K. 1977. Anatomía Vegetal. Omega, Barcelona 714 pp.
27. Everett, N. Wang, T. Gould, A and Street, H. 1981. Studies on the Control of the Cell-Cycle in Cultured Plant Cells. Protoplasma 106: 15-22 pp.
28. Fakhrai H and Fakhrai F. 1990. Hormonal Control of Growth and Development. In Molecular Biology, Plant Cell and Tissue Culture. Methods Vol 6. Humana Press. New Jersey 49-56 pp
29. Fowler M, Watson R and Lyons Y. 1982. Substrate Utilisation, Carbon and Nitrogen by Suspension Cultured Plant Cells. Proc. 5th. Intl. Cong. Plant. Tissue. & Cell Culture.
30. Fujita Y, and Tabata M. 1987. Secondary Metabolites from Plant Cells, Pharmaceutical Applications and Progress in Comercial Production. Proc. of the 5th Int. Cong.on Plant Tissue and Cell Culture. Univ Minnesota. De. Green, E. Sommers, D. Hackii, W and Biesboer, D. 169-185 pp.
31. Gantt J and Key J. 1985. Coordinated expression of ribosomal proteins in RNAs Following auxin treatment of soy bean hypocotyls. J Biol Chem 260: 6175-6181 pp.
32. Gehling C, Irving H, Parish R. 1990. Effects of Auxin and Abscisic Acid on Cytosolic Calcium and pH in Plant Cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 9645-9649
33. George E and Serrington P. 1984. Plant Regeneration by Tissue Culture. Exegetics Ltd. Eversley, Engl and . 709 pp.
34. Green C. and Phillips R. 1975. Plant Regeneration from Tissue Cultures of Maize. Crop Sci. 15: 417-420.
35. Green C. 1982. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Friable Callus of Zea mays. in Plant Tissue Culture. Fujiwara A. Maruzen Co. Ltd. Tokyo 107 pp
36. Guilfoyle T. 1980. Auxin Induced Deoxyribonucleic Acid Dependent Ribonucleic Acid Polymerase Activities in Mature Hypocotyl. Biochemistry 19: 6112-6118.
37. Harms C. Lorz H and Portikus N. 1976. Regeneration of Plantlets from Callus Cultures of Zea mays L. Z Pflanzenphysiol. 77: 347-351.

38. Harvey B. Lu B and Fletcher A. 1974. Ba Accelerates Chloroplast Differentiation and Stimulates Photosynthetic Enzyme Activity in Cucumber Cotyledons. Can. J. Bot. 52: 2481-2486.
39. Hasler P, Brot N, Weissbach H, Parnassa A and Elkon K. 1991. Ribosomal Proteins PO,P1 and P2 are Phosphorylated by Casein Kinase II at Their Conserved Carboxyl Termini. J. Biol. Chem. 266: 13815-13820.
40. Hill, W. Dahlberg, A. Garrett, R. Moore, P. Schlessinger, D and Warner, J. 1990. The Ribosome Structure, Function & Evolution. American Society for Microbiology. Washington D.C. 160-167 pp.
41. Hobbie, L. Timpte, C and Estelle, M. 1994. Molecular Genetics of Auxin and Cytokinin. Plant. Mol. Biol. 26: 1499-1519
42. Hurtado, D and Merino, M. 1987. Cultivo de Tejidos Vegetales. Ed Trillas 65-87 pp.
43. Jacobs, W. 1979. Other Developmental Effects of Auxins. En Plant Hormones and plant development. Cap IV. Cambridge Univ. Press. Cambridge. 73-102 pp.
44. Jacobs, M. and Ray, P. 1976. Rapid Auxin Induced Decrease in Free Space pH and its Relationship to Auxin-Induced Growth in Maize and Pea. Plant Physiol. 58: 203-209.
45. Jonak C, Heberle-Bors E, Hirt H. 1994. MAP kinases Universal Multi-Purpose Signalling Tools. Plant Mol Biol. 24: 407-416
46. Kaminek, M. 1992. Progress in Cytokinin Research. Trends Biotechnol. 10: 159-164
47. Karavaiko, N. Krawiars, K. Khokhlova, V and Kulaeva, O. 1978. Fiziol. Rast. 24: 83.
48. Klee, H and Romano, Ch. 1994. The Roles of Phytohormones in Development as Studied in Transgenic Plants. Critical Reviews in Plant Sciences: 13 (4): 311-324.
49. Kulaeva, O. 1981. Cytokinin Action on Transcription and Translation in Plants. in Metabolism and Molecular Activities of Cytokinins. Ed Guern,J and Péaud,L. Sprin-Verlag. Berlin Hiedelberg.
50. Langezaai. C. and Scheffer, J. 1992. Initiation and Growth Characterization of Some Hop Cell Suspension Cultures. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 30: 159-164.

51. Lehninger A, Nelson D and Cox M. 1993. Biochemistry. Worth Publishers NY. 1116 pp.
52. Lewin, B. 1993. Genes V. Oxford University Press. New York. 1272 pp
53. Li, Y. Hagen, G. Guilfoyle, T. 1991. An Auxin-Responsive Promoter is Differentially Induced by Auxin Gradients During Tropisms. Plant Cell. 3: 1167-1175
54. Marten, Y. Lohse, G and Hedrich, R. 1991. Plant Growth Hormones Control Voltage-Dependent Activity of Anion Channels in Plasma Membrane of Guard Cells. Nature 353: 758-762.
55. Matsubara S. 1990. Structure Activity relationships of Cytokinin. Critical Reviews in Plant Science. Vol 9 Issue 1. 17-56
56. McGaw B. 1988. Cytokinin Biosynthesis and Metabolism. In Davies P. (ed) Plant Hormones and their Role in Plant Growth Development Kluwer Academic Publishers 76-93 pp.
57. Moore, T. 1989. Biochemistry and Physiology of Plant Hormones. Springer-Verlag. N.Y Inc. USA. 330 pp.
58. Murashige T, and Skoog F. 1962. A Revised Medium for a Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497
59. Napier R, Venis M. 1995. Auxin Action and Auxin-Binding Proteins. New Phytol. 129 : 167-201.
60. Nomura, M., Gourse, R., and Bauchman, G. 1984. Regulation of the Synthesis of Ribosomal Components. Ann. Rev. Biochem. 53: 75-129.
61. Orton, T. 1984. Somaclonal Variation: Theoretical and Practical Considerations. In Gene Manipulation in Plant Improvement. Plenum Press, New York. 427-468 pp.
62. Palme, K. 1993. From Binding Proteins to Hormonal Receptors? J Plant Growth Regul. 12:171-178.
63. Payo, J. Santana, R. Remacha, M. Ballesta, M. and Zinker, S. 1995. Eukaryotic Acidic Phosphoproteins Interact with the Ribosome through Their Amino-Terminal Domain. Biochem. 34: 7941-7948.

64. Pérez, L. Aguilar, R. and Sánchez de Jimenez, E. 1987. Effect of Exogenous Auxin on Maize Tissues. Alteration of Protein Synthesis and Phosphorylation. *Physiol. Plantarum* 69: 517-522 pp.
65. Pérez, L. Aguilar, R. Pérez-Méndez, A and Sánchez de Jiménez, E. 1990. Phosphorylation of Ribosomal Proteins Induced by Auxins in Maize Embryonic Tissues. *Plant Physiol.* 94: 1270-1275 pp.
66. Pollard J and Walkers J. 1990. Plant Cell and Tissue Culture. in *Methods in Molecular Biology*, Vol 6. Humana Press. New Jersey 49-56 pp.
67. Reyes- Castañeda, P. 1990. El Maíz and su Cultivo. AGT Editor S.A. México. 460 pp.
68. Reyes, J. Jiménez, G. González, M. and Vázquez, R. 1991. Benziladenine Stimulation of Nuclear DNA Synthesis and Cell Division in Germinating Maize. *Seed Science Research.*
69. Rhodes , Lowe K and Roby K. 1988. Plant Regeneration from Protoplast Isolated from Embryogenic Maize Cell Cultures. *Bio/Tecnology* 6: 56-60.
70. Saenz-Robles J, Remacha M, Vilella M, Zinker S. and Ballesta J. 1990. The PRA₆ as Regulators of the Eukariotic Ribosomal Activity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1050: 51-55.
71. Sánchez J. Albores M and Loyola V. 1981. Effect of 2-4-D Analogues on the Induction and Maintenance of Callus in Maize Tissue Culture. *Ann Apl biol.* 98: 347-353.
72. Santos C, Ballesta J. 1994. Ribosomal Protein P0, Contrary to Phosphoproteins P1 and P2, Is Required for Ribosome Activity and Saccharomyces cerevisiae Viability. *Journal of Biological Chemistry.* 15689-15696
73. Santos M. and Torné J. 1986. A Comparative Analysis Between Totipotency and Growth Enviroment Conditions of the Donor Plants in Tissue Culture of Zea mays L. J. *Plant Physiol.* 123: 299-305.
74. Sellmer j, Ritchie S, Kim Y and Hodges T. 1993. Initiation, Maintenance, and Plant Regeneration of Type II Callus and Suspension Cultures. In *Freeling M, and Walbot V. The Maize Handbook.* Springer Lab. N.Y. 663-671 pp.

75. Steiner, R., Pomerantz, S., 1981. The Chemistry of Living Systems. Ed. Van Nostr and Company. N.Y. 537 pp.
76. Skoog F, and Miller C. 1957. Chemical Regulation of Growth and Organ Formation in Plant Tissues Cultured in vitro. Soc Exp Biol Symp. 11: 188-231
77. Strickberger M. 1988. Genética. Ed. Omega 593-598 pp.
78. Stryer L. 1988. Bioquímica. Tercera Edición. Tomo 2. Ed. Reverté. México 1084 pp.
79. Suprasanna P, Rao K and Reddy M. 1986. Plantlet Regeneration from Glume Calli of Maize (Zea mays L.) Theor. Appl. Genet. 72: 120-122.
80. Takegami T. and Yoshida K. 1977. Specific Interaction of Cytokinin Binding Protein with 40S Ribosomal Subunits in the Presence of Cytokinin in vitro. Plant & Cell Physiol. 18: 337-346.
81. Tepfer D, and Foslet D. 1978. Hormone-Mediated Translation Control of Protein Synthesis in Cultured Cells of Glicine max. Devel. Biol. 62: 486-497.
82. Tetley, R and Thimann, K. 1974. Metabolism of the Oat Leaves During Senescence. Respiration Carbohidrate metabolism and the action of citokinins. Plant Physiol. 54: 859-862 pp.
83. Thomas G. 1977. The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination. Ed A. A. Khan. Amsterdam. 111 p.
84. Thorpe T. 1978. Frontiers of Oplant Tissue Culture. Publicado por International Association for Plant Tissue Culture 1978. Alberta Canadá.
85. Tomes D. 1985. Opportunities and Limitation of the Genotipic Influences on Establishment and Plant Regeneration from Callus and Cell Cultures of Crop Species. En: Biotechnology in Plant Sciences. Academic Press. New York. 3-14 pp.
86. Torres K. 1988. Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops. AVI Publishers. N.Y. 151-160 pp.
87. Vain P. Yean H. & Flament P. 1989. Enhancement of Production and Regeneration of Embryonic Type II Callus In Zea mays, L. by Ag NO3. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 18: 143-151 pp.

88. Vasil K. 1987. Developing Cell and Tissue Culture System of the Improvement of Cereal and Grass Crops. J. Plant Physiol. 128: 193-218.
89. Vázquez R. and Reyes J. 1990. Stimulation of DNA Synthesis and DNA Polymerase Activity by Benzyladenine During Early Germination of Maize Axes. Canadian J. Bot.
90. Wang A. 1987. Callus Induction and Plant Regeneration from Maize Mature Embryos. Plant Cell Reports. 6: 360-362.
91. Wool Y, Chan Y, Glück A, and Suzuki K. 1991. The primary Structure of Rat Ribosomal Proteins P0, P1 and P2 and a Proposal for a uniform Nomenclature for Mammalian and Yeast Ribosomal Proteins. Biochimie. 73: 861-870.
92. Yi H, Park D, and Lee Y. 1996. In vivo Evidence for the Involvement of Phospholipase A and Protein Kinase in Signal Transduction Pathway for Auxin Induced Corn Coleoptile Elongation. Physiologia Plantarum 96: 356-368.
93. Zeroni M. and Hall M. 1980. Molecular Effects of Hormone Treatment on Tissue. En Hormonal Regulation of Development. Encyclopedia of Plant Physiology. New Series. Vol 9. Ed. Mc Millan N.Y. 520-530 pp.
94. Hershey J. 1991. Annu. Rev. Biochem. 60: 717-755
95. Thomas G, Siegman M, Kubler A, Gordon J, and Jiménez de Asua L. 1980. Regulation of 40s Ribosomal Protein Phosphorylation in Swiss Mouse 3T3 Cells. Cell 19: 1015-1023

VIII APÉNDICE

NOMBRE DEL COMPUESTO	FÓRMULA	MS (g L ⁻¹)	R2 (g L ⁻¹)
Macronutrientes			
Nitrato de Amonio	NH ₄ NO ₃	1.65	0.825
Nitrato de Potasio	KNO ₃	1.9	0.953
Sulfato de Magnesio	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.37	0.37
Fosfato Mono Básico de Potasio	KHPO ₄	0.17	0.17
Cloruro de Calcio	CaCl	0.44	0.44
Micronutrientes			
Acido Bórico	H ₃ BO ₃	0.0062	0.0062
Sulfato de Manganeso	MnSO ₄ ·H ₂ O	0.0169	0.0189
Sulfato de Zinc	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.0086	0.0086
Yoduro de Potasio	KI	0.00083	0.0008
Molibdato de Sodio	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.00025	0.0003
Sulfato de Cobre	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.00002	0.00003
		5	
Cloruro de Cobalto	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.00002	0.00003
		5	
Sulfato de Hierro	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.02784	0.0278
Etilen-Diamino-Tetracetato de Sodio	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₁₀ Na ₂ ·2H ₂ O	0.03724	0.0373

Tabla 1. Compuestos inorgánicos usados en el medio propuesto por Murashige y Skoog (MS) y en el medio R2 (MS modificado por Sánchez de Jiménez, 1981).

Compuesto	Vitaminas MS g/l 100X	Vitaminas MS* g/l	Coctel 20 g/l 100X
Inositol	20	10	14.5
Ac. nicotínico	0.1	0.1	0.15
Piridoxina	0.1	0.1	0.15
Tiamina	0.1	0.1	0.3
Glicina	0.4	0.02	
Adenina			0.02
Biotina			0.1
Ac. fólico			0.1
Ac. aspártico			7.5
L-Asparagina			1
L-Arginina			1
L- Glutamina			6
Urea			4.5
Ac-Glutámico			0.75
Riboflavina			0.01

Tabla 2. Soluciones madre de los compuestos orgánicos usados en el medio MS (VMS), MS modificadas (VMS*) y en el suplemento Coctel 20. Estas soluciones se aplican usando 10 ml/l de medio de cultivo

Trat/medio	KIN1	KIN2	BaC	BaVMS	2ipC	2ipVMS
K1	+					
K2		+				
BA			+	+		
2ip					+	+
VMS	+	+		+		+
Coctel 20			+		+	

Tabla 3. Tratamientos probados para el establecimiento de cultivos en suspensión de callos de embriones maduros (SEM.)

K1: Cinetina a una concentración de 0.01 mg L^{-1} . K2: Cinetina a una concentración de 0.1 mg L^{-1}
 BA: BA a una concentración de 0.1 mg L^{-1} . 2ip: 0.1 mg L^{-1} de 2ip. VMS*: 10 ml L^{-1} de VMS más 0.01 mg L^{-1} de glicina. Coctel 20: 10 ml L^{-1} de coctel 20 más 1 mg L^{-1} de adenina.

Compuesto	Vitaminas MS g/l 100X	Vitaminas MS* g/l	Coctel 20 g/l 100%
Inositol	20	10	14.5
Ac. nicotínico	0.1	0.1	0.15
Piridoxina	0.1	0.1	0.15
Tiamina	0.1	0.1	0.3
Glicina	0.4	0.02	
Adenina			0.02
Biotina			0.1
Ac. fólico			0.1
Ac. aspártico			7.5
L-Asparagina			1
L-Arginina			1
L- Glutamina			6
Urea			4.5
Ac-Glutámico			0.75
Riboflavina			0.01

Tabla 2. Soluciones madre de los compuestos orgánicos usados en el medio MS (VMS), MS modificadas (VMS*) y en el suplemento Coctel 20. Estas soluciones se aplican usando 10 ml/l de medio de cultivo