



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE **TUXTLA GUTIÉRREZ**

Informe Técnico de Residencia Profesional

“Análisis proteómico diferencial de los estados de desarrollo de embriones somáticos de *Agave americana* L.”

Presenta:

Ramírez Merchant Martha Leticia..... 08270367

Asesor:

Dr. Federico Antonio Gutiérrez Miceli.

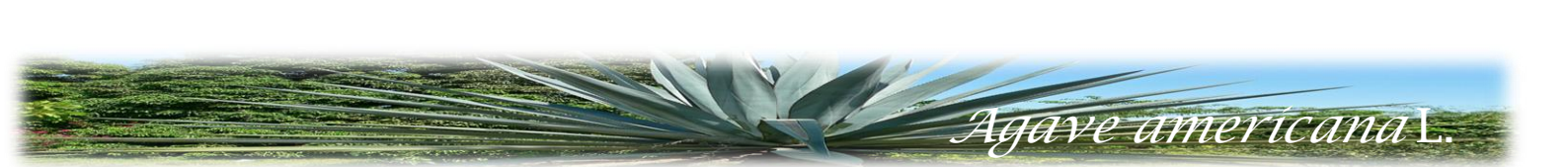
Ingeniería Bioquímica

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA Y BIOQUÍMICA

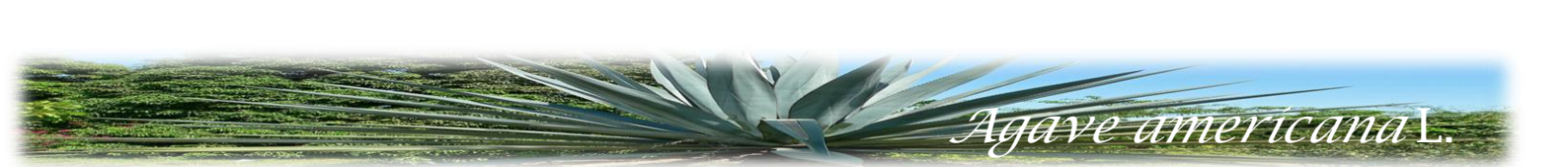
Miércoles 26 de junio de 2013

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	5
2. JUSTIFICACIÓN.....	6
3. OBJETIVOS.....	7
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	7
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
4. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE TRABAJO.....	8
5. PROBLEMAS A RESOLVER.....	9
6. ALCANCES Y LIMITACIONES.....	9
7. FUNDAMENTO TEÓRICO.....	10
7.1 AGAVE americana L.....	10
7.1.1 DESCRIPCIÓN.....	10
7.1.2 DISTRIBUCIÓN.....	12
7.1.3 HÁBITAT Y FENOLOGÍA.....	13
7.1.4 NOMBRE COMÚN Y USOS.....	14
7.2 MICROPROPAGACIÓN.....	14
7.2.1 CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE TEJIDOS VEGETALES.....	14
7.2.2 MEDIO DE CULTIVO.....	14
7.2.2.1 ELEMENTOS MINERALES INORGANICOS.....	15
7.2.2.2 COMPONENTES ÓRGANICOS.....	16
7.2.3 AGENTES GELATINIZADORES.....	17
7.2.4 POTENCIAL DE HIDROGENO.....	17
7.2.5 ETAPAS DE LA PROPAGACIÓN <i>IN VITRO</i>	17
7.2.5.1 ETAPA 0: SELECCIÓN DE DONADORA Y PREPARACIÓN.....	17
7.2.5.2 ETAPA 1: ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO ASPTICO.....	17
7.2.5.3 ETAPA 2: MULTIPLICACIÓN.....	19
7.2.5.4 ETAPA 3: ENRAIZAMIENTO.....	19
7.2.5.5 ETAPA 4: TRANSFERENCIA EN MEDIOAMBIENTE NATURAL.....	19
7.3 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	20
7.3.1 ORIGEN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	21
7.3.2 CARACTERÍSTICAS DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	21
7.3.3 ASPECTOS MORFOLÓGICOS Y FISIOLÓGICOS DE LA	22



EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	22
7.3.3.1 MORFOLOGIA DE LOS EMBRIONES SOMÁTICO.....	22
7.3.3.2 ESTRUCTURA DE LOS EMBRIONES SOMÁTICO.....	23
7.3.3.3 DIRECCION DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	23
7.4 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA....	25
7.4.1 GENOTIPO.....	25
7.4.2 EXPLANTE.....	26
7.4.3 REGULADORES DE CRECIMIENTO.....	26
7.4.4 CONDICIONES DE CULTIVO.....	27
7.5 ETAPAS DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	28
7.5.1 INDUCCIÓN.....	28
7.5.2 ESTABLECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DE CELULAS EN SUSPENSIÓN.....	29
7.5.3 FORMACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS.....	30
7.5.4 GEMINACIÓN Y CONVERSACIÓN DE LOS EMBRIONES SOMÁTICOS EN PLANTAS.....	30
7.6 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEINA.....	30
7.7 ELCTROFORESIS DE PROTEINA.....	33
7.8 ESPECTROMETRIA DE MASAS.....	35
8. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS...	37
8.1 MULTIPLICACIÓN Y CRECIMIENTO DE CALLOGÉNESIS.....	37
8.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....	37
8.1.2 MEDIO DE CULTIVO UTILIZADO.....	38
8.1.3 MULTIPLICACIÓN DE LOS EXPLANTES.....	38
8.1.3.1 INDUCCIÓN DE LOS EXPLANTES.....	39
8.1.4 INDUCCIÓN DE CALLOGÉNESIS.....	39
9. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	42
9.1 ANALISIS ESTADISTICO DE CALLOS.....	42
9.2 PORCENTAJE DE FORMACIÓN DE CALLOS CON E FACTOR 2,4-D.....	42
9.3 EXPLANTES QUE PRESENTARON GENERACIÓN DE TEJIDO CALLOSO.....	42
9.4 MUESTRA DE LA MEDIA DE CALLOS PARA CADA CONCENTRACIÓN DE 2,4-D.....	43



10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	44
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

1.- INTRODUCCIÓN

La familia Agavaceae posee un amplio número de especies de importancia económica por que constituyen una fuente renovable de alimento, azúcares, almíbar, fibras, celulosa, sapogeninas, ensilado para ganado, productos farmacéuticos, bebidas, plantas ornamentales y otros productos más.

Una de las plantas que crece y se adapta muy bien a tierras áridas y secas de nuestro territorio es el *Agave americana* L., planta comúnmente conocida en muchos lugares de nuestro país como maguey, paja o cabuya. Esta planta es originaria de México y en la actualidad crece casi en todo los valles interandinos del Perú, también crece en muchos países en los cuales se le ha estudiado y dado mayor importancia principalmente con fines medicinales.

Agave americana L. se ha propagado convencionalmente en forma asexual por separación de hijuelos, los cuales se desarrollan de rizomas producidos por cultivos establecidos en campo por varios años. Otra forma eficiente de propagación asexual es mediante la micropropagación o cultivo *in vitro*.

Sea comprobado que el cultivo de tejidos tiene un importante papel en el proceso de modificar la composición genética de las plantas a través del uso de la biotecnología, ya que actúa como un intermediario entre los avances hechos por la biología molecular en el aislamiento y modificación de genes y la regeneración de plantas transformadas para ser evaluadas por los genéticos y fitomejoradores (Smith y Drew, 1990).

Dentro de las técnicas de cultivos de tejidos la embriogénesis somática es considerada una poderosa herramienta para la regeneración y mejoramiento genético de plantas, que puede ser inducida en forma directa sobre el explante o indirectamente a partir de callo. Este proceso morfogénico se favorece mediante la transferencia de los explantes de un medio de cultivo suplementado con altas concentraciones de auxinas, a uno libre de este tipo de reguladores del crecimiento. Teniendo como ventajas el proceso de controlar fácilmente el medio ambiente y fases de desarrollo, y un gran número de embriones pueden ser obtenidos libres de patógenos.

La capacidad para producir embriones somáticos está genéticamente predeterminada (Von Arnold *et al.*, 2002), por lo que la respuesta ante tratamientos varía según la especie con la cual se esté trabajando.

2.- JUSTIFICACIÓN

El agave, *Agave americana* L., es un cultivo de suma importancia a nivel agroindustrial, ya que cuenta con una amplia superficie cosechada, donde la mayor parte de las plantas se destinan para la obtención de bebidas alcohólicas con denominación de origen como el tequila y el mezcal dándole así una gran fuente de recursos económicos para la población.

Hoy en día la biología vegetal moderna requiere de herramientas que permitan la regeneración y multiplicación de plantas, así como de modelos que permitan estudiar procesos como el de diferenciación celular de una forma más efectiva que la de los modelos que se encuentran en la naturaleza, como es la embriogénesis somática por ello su estudio es un factor indispensable en la aplicación de las nuevas tecnologías biotecnológicas.

La embriogénesis somática es un proceso por el cual las células somáticas se desarrollan a través de estados de la embriogenia para dar lugar a plantas completas sin fusión gamética. Este proceso consta de varias fases: inducción de cultivos embriogénicos, mantenimiento y proliferación de los mismos, maduración de embriones somáticos, germinación y aclimatación de las plantas obtenidas. Para que cada una de estas etapas transcurra adecuadamente y el proceso final resulte con éxito, determinados tratamientos químicos y físicos deben ser aplicados en el momento adecuado (Von Arnold *et al.*, 2005).

Como se sabe los cultivos embriogénicos proliferan sin dificultad en el mismo medio y condiciones de cultivo utilizadas para la fase de inducción. Sin embargo, y a pesar de la buena calidad de los cultivos, la conservación de los embriones somáticos en plantas presentan muchas dificultades y las tasas de germinación que se obtienen son bajas. Este hecho, es común en muchos sistemas de embriogénesis somática (Janick, 1993), se ha atribuido a dos causas fundamentales: pobre calidad de los embriones somáticos formados y maduración deficiente.

Pocos estudios se han ocupado de las comparaciones de cada paso de la maduración del embrión en el nivel de proteoma, especialmente en las plantas leñosas (Dodeman y Ducreux 1996; Lippert *et al.* 2005; Chivasa *et al.* 2006, Gallardo *et al.* 2006). Sin embargo, estos datos revela que la inducción y desarrollo de embriones somáticos sigue un complejo vía e implica una serie de proteínas desconocidas, algunos de los cuales están asociados con las vías de desarrollo que conduce a la formación de embriones somáticos completos (Dodeman *et al.* 1997).

3.- OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- ✚ Detectar e identificar las proteínas que se expresan durante las diferentes etapas de desarrollo de los embriones somáticos de *Agave americana L.*

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✚ Identificar las diferentes etapas de desarrollo de los embriones somáticos de *Agave americana L.*
- ✚ Extracción y cuantificación de proteínas, implementando la electroforesis y análisis de gel.
- ✚ Implementación de técnica de digestión de proteína con tripsina.
- ✚ Análisis por espectrometría de masas.

4.- CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE TRABAJO

El proyecto se llevo a cabo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos, situado en la planta alta del edificio Z. De manera general, en este laboratorio se realizan pruebas de micropropagación in vitro de tejidos vegetales y pruebas de biología molecular, localizado en el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, ubicado en Carretera Panamericana Km 1080.

El laboratorio de Investigación de Cultivo de Tejidos cuenta con el equipo requerido para realizar el proyecto, tales como un cuarto de inoculación, balanza analítica, agitadoras, reactivos, material de cristalería, vórtex, cámaras de incubación, un autoclave, microscopio electrónico, horno de microondas.

5.- PROBLEMAS A RESOLVER

Identificar que tipos de proteínas se encuentra en la síntesis proteómica de las diferentes etapas de desarrollo de los embriones somáticos.

6.- ALCANCES Y LIMITACIONES

Los objetivos planteados en este proyecto no fueron alcanzados debido a que el periodo de crecimiento de los callos, se da en un tiempo prolongado, alrededor de 6 a 8 semanas, sin embargo, se encontraron algunas limitaciones como fue la falta de reactivos para la elaboración del medio de cultivo, el cual tardo mucho tiempo en llegar.

Otra de las limitantes por las cuales no se cumplieron los objetivos fue por la contaminación que se dio durante el periodo de crecimiento de los callos, cuando estos ya tenían un tiempo considerable de incubación.

7.- MARCO TEÓRICO

7.1 *Agave americana L.*

La familia Agavaceae es endémica de América, se distribuye desde el sur de Estados Unidos de América a Colombia y Venezuela, y está conformada por nueve géneros y 340 especies. El centro de mayor riqueza y diversidad biológica se encuentra en México, donde se encuentran 261 especies (75% del total) con 177 endémicas (70%) (Reynoso *et al.*, 2011).

El género más grande y diverso es *Agave spp.*, con 159 especies, de las cuales 119 son endémicas de México, representando 74%. Dentro de las aplicaciones más importantes de los agaves o magueyes por los grupos humanos está su uso como fuente de fibras duras, alimentación y elaboración de bebidas alcohólicas fermentadas y destiladas (Reynoso *et al.*, 2011).

7.1.1 DESCRIPCIÓN

Pertenece al grupo Americana propuesto por Gentry (1982) y se reconoce por tener rosetas de hasta dos metros de alto, 2.5-3.0 m de diámetro, hojas de 1.5-2.0 m de largo, 15-25 cm de ancho, lanceoladas, ligeramente espatuladas, erectas y en ocasiones poco curvadas, acanaladas en el haz, glaucas, y de superficie ligeramente áspera y margen ondulado a crenado; dientes sobre mamilas, en la parte media de 0.5-1.0 cm de largo, 0.6- 1.2 cm de ancho, rectos o recurvados; espina terminal 3.5-4.0 cm de largo. Inflorescencia paniculada, laxa de 6-9 m alto, contorno general ovalado, fértil desde la mitad o el tercio superior, ramas primarias 20-35, 1-1.2 m largo; pedúnculo verde-glaucos, brácteas del pedúnculo 30-60 cm largo, base hasta 10 cm ancho, triangulares, cactáceas, margen entero, espina 1-1.5 mm largo. Flores 6-7.5 cm largo, hipocrateriformes, verde-amarillentas; tépalos 2.5-3.5 cm largo, oblongos, gruesos, tubo del perigonio 1-1.5 cm largo, ovario 2.5-3 cm largo, cuello 2-5 mm; estambres con filamentos 5.5-8.0 cm largo, insertos en la parte media del tubo. Cápsulas 4.0-5.5 cm largo, 2.0- 2.5 cm ancho; semillas 9-10 mm largo, 7-8 mm ancho, negras (Figuras 1 y 2).

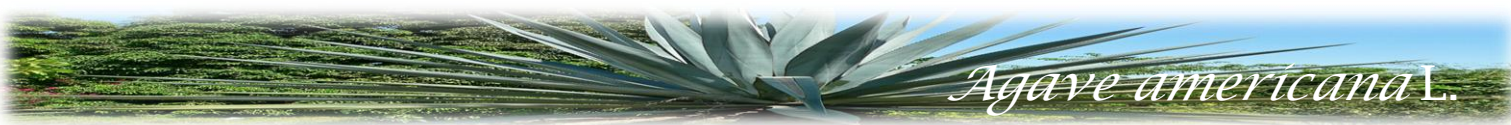


Figura 1. Plantas de *Agave americana* L., en la región de Comitán, Chiapas



Figura

2. Morfología vegetativa y reproductiva de *Agave americana* L., en la región de Comitán, Chiapas.

Agave americana L. se utiliza también para la extracción de aguamiel y la elaboración de pulque. En Chiapas es la especie que se usa primordialmente para la elaboración del licor comiteco. En Oaxaca, la variedad hortícola de *Agave americana*, conocida como “maguey arroqueño”, se emplea para la producción de mezcal (Espinosa *et al.*, 2002).

Agave americana L. es una especie polimórfica con numerosas formas cultivadas en varias regiones del mundo y que han sido seleccionadas y manejadas por el hombre durante miles de años. La variación intraespecífica observada incluye variación en el tamaño de la planta, número y forma de las hojas, disposición de las mismas en el espacio, forma del margen, tamaño de los dientes, y tamaño de la espina terminal; sin embargo, podemos reconocerla por la siguiente combinación de caracteres: hojas lanceoladas a algo espatuladas, erectas, recurvadas o reflejas, glaucas, a veces con bandas transversales verdosas, superficie ligeramente áspera al tacto, margen ondulado a crenado, dientes no mayores de un centímetro de largo y espina terminal corta, hasta de 4 cm de largo; flores de 6-7.5 cm de largo con el ovario más corto que el tubo y los tépalos. A este respecto, Gentry (1982) reconoce una subespecie y ocho variedades.

7.1.2 DISTRIBUCIÓN

Agave americana L. es una especie nativa del sur de los Estados Unidos de América y México, ampliamente cultivada en todo el mundo. En Chiapas se observa en los municipios de Venustiano Carranza, Comitán de Domínguez y Las Rosas (Figura 3). Las localidades, las coordenadas geográficas, la altitud y el mapa de distribución, se muestran en el cuadro 1.

Localidad	Municipio	Latitud norte	Longitud oeste	Altitud (msnm)
Agua Bendita	Venustiano Carranza	16° 14'28.4"	92°25'30.5"	632
Chacajolcom	Comitán	16°18'17.59"	92°11'08.56"	1820
Ejido Las Flores	Comitán	16°13'19.4"	92°08'54.5"	1715
Los Riegos	Comitán	16°18'21.1"	92°07'29.5"	1605
NE de la Ciudad de Comitán	Comitán	16°15'40.7"	92°08'11.5"	1643
San José de Las Rosas	Comitán	16°23'58.2"	92°12'46.6"	2251
Tuilaito Punta de Diamante	Comitán	16°16'24.90"	92°09'56.1"	1858
Yalpalé	Las Rosas	16°19'40.6"	92°24'36.5"	1010

Cuadro 1. Ubicación de localidades con plantaciones de *Agave americana*

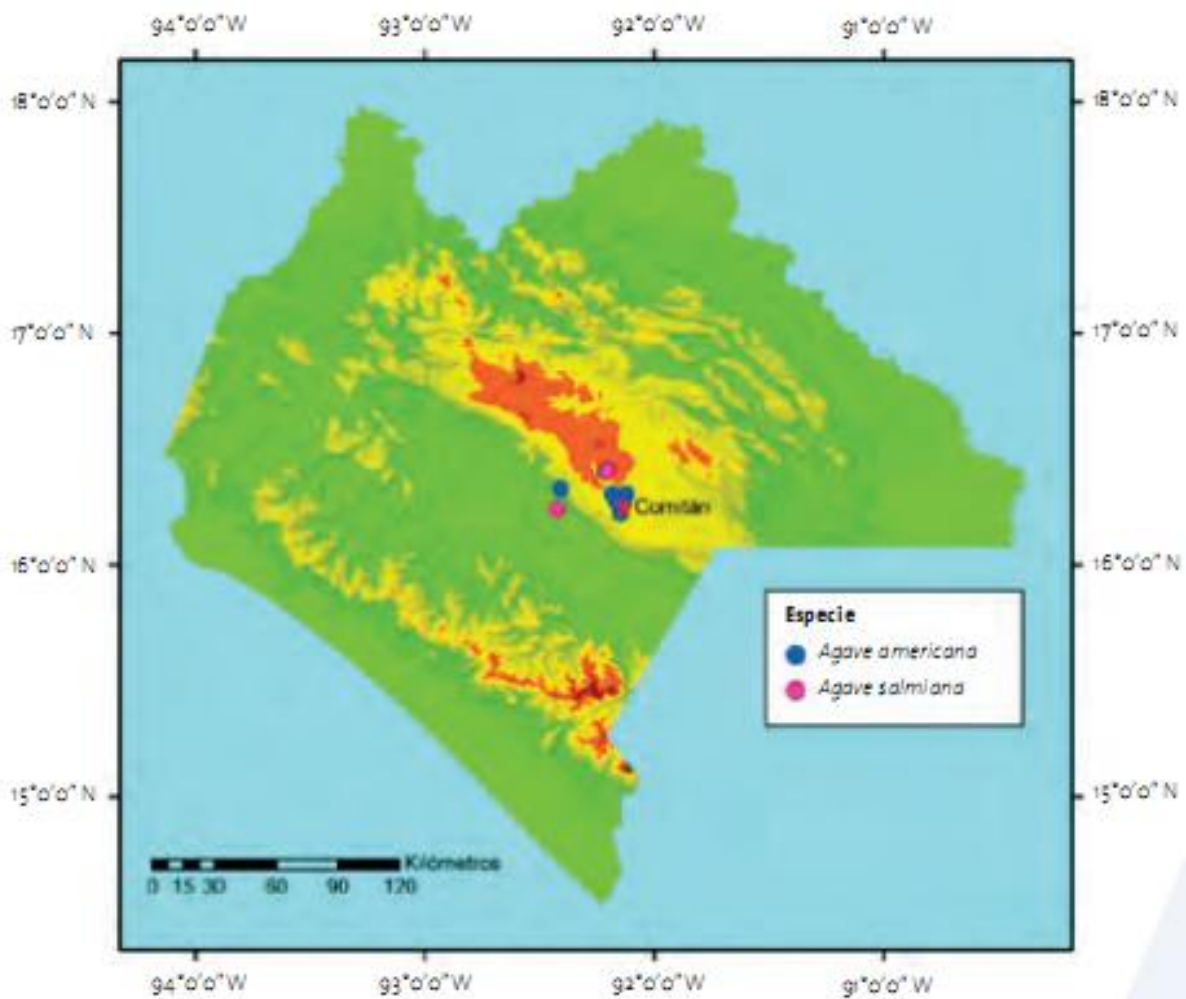


Figura 3. Ubicación de plantaciones de *Agave americana* L. y *Agave salmiana* en la Meseta Comiteca de Chiapas

7.1.3 HÁBITAT Y FENOLOGÍA

Cultivada como ornamental en pueblos y ciudades de México. En Chiapas crece preferentemente en altitudes entre los 1,000 y 1,860 msnm de altitud. En general, se observó que las plantas prosperan en laderas de roca caliza, sitios inclinados y terrenos con pendiente suave, en lugares abiertos, rocosos y suelos pedregosos. En los alrededores donde se cultiva se puede observar vegetación secundaria derivada de la selva baja caducifolia y sólo en la localidad de San José de las Rosas la vegetación circundante consiste de bosque de Pinus-Quercus. Estas especies de agave florecen entre los meses de Julio y Agosto (Reynoso *et al.*, 2011).

7.1.4 NOMBRE COMÚN Y USOS

“Maguey comiteco en Chiapas. Ornamental, como cerco vivo, quites secos empleados en la construcción. Se utiliza también para la extracción de aguamiel y la elaboración de pulque. En Chiapas es la especie que se usa primordialmente para la elaboración del licor comiteco. En Oaxaca, la variedad hortícola de *Agave americana* L. conocida como “maguey arroqueño” se emplea para la producción de mezcal (Espinosa *et al.* 2002).

7.2 MICROPROPAGACIÓN

7.2.1 CULTIVO *IN VITRO* DE TEJIDOS VEGETALES

El cultivo de tejidos vegetales comprende un grupo de técnicas, que estudia el crecimiento de células, tejidos u órganos de plantas (explante) en un medio artificial aséptico. El término *in vitro*, proviene del latín en vidrio, debido a que se cultiva en recipiente de vidrio o plástico que contienen el medio artificial, compuesto de una dieta balanceada de nutrientes y reguladores de crecimiento, en condiciones asépticas y ambientales controladas, lo cual permite ejercer un control relativo sobre los procesos morfogénéticos, fisiológicos y bioquímicos que ocurren en el explante en estudio (George *et al.*, 2008)

La totipotencialidad celular, propuesta en 1092 por Haberlandt, y la hipótesis del balance hormonal sugerida por Skoog *et al.* En 1957, constituyen los principios más importantes, según Roca y Mroginski (1991), en los que se fundamentan las técnicas desarrolladas en cultivos de tejidos *in vitro*, donde la totipotencia puede ser definida como la capacidad que tienen las células vegetales para desarrollar plantas completas.

Las técnicas de cultivo *in vitro* se han utilizado en el mejoramiento genético, la obtención de plantas libres de virus y otros patógenos, la conservación del germoplasma y en micropropagación, la cual involucra que las plántulas que se producen puedan crecer y ser fenotípica y genotípicamente idénticas a la planta madre de la cual se derivan (Roca y Mroginski, 1991). La ventaja más importante obtenida por la micropropagación sobre los métodos convencionales es que en un tiempo y espacio relativamente corto, una gran cantidad de plantas pueden ser producidas a partir de un solo individuo pudiéndose obtener aproximadamente un millón de propágulos en un periodo de seis meses, considerando una tasa de multiplicación de diez yemas axilares a partir de un solo explante (Chawla, 2004).

7.2.2 MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo seleccionado dependerá de la especie a ser sembrada, de la técnica de cultivo que se emplee, de la edad y del tipo del explante, debido a que la composición del medio influye en el crecimiento y morfogénesis de los tejidos de la planta. Los principales componentes de la mayoría de medios de cultivo son macro y micro nutrientes (nutrientes inorgánicos), reguladores de crecimiento, vitaminas, fuente de carbono, suplementos no definidos, agentes gelatinizadores y 95% de agua (Trigiano y Gray, 2005).

7.2.2.1 Elementos minerales inorgánicos

La vida y el crecimiento de una plan *in vitro* requiere de macros y micro nutriente combinados y su concentración es dependiente de la especie, donde los elementos requeridos en concentraciones mayores que $0,5\text{mmol.L}^{-1}$ son referidos como macronutrientes y menores que a $0,5\text{mmol L}^{-1}$ como micronutrientes. Los macronutrientes comprenden los elementos: fósforo (P), potasio (K), nitrógeno (N), azufre (Z), calcio (Ca), y magnesio (Mg); presentes como sales en el medio y son esenciales para el desarrollo de la planta (Razdan, 2003).

El nitrógeno es un elemento esencial en la molécula de ácidos nucléico, proteínas, clorofila, aminoácidos, alcaloides y algunas hormonas de plantas, además que influye en el enraizamiento de brotes *in vitro*. Lafuente de nitrógeno esta suplida por los iones nitrato y los iones amonio. Entre otras funciones de los macronutrientes tenemos que: el fosfato se encuentra en tejidos de rápido crecimiento en las plantas, el cual es requerido en la fotosíntesis y respiración ya que forma parte de las moléculas de ADP y ATP; mientras que el positivo ayuda en la síntesis de carbohidratos y proteínas, en la normal división celular promueve el crecimiento meristemático además d tener un rol principal en la homeostasis celular; de igual manera, el calcio es componente de la pared celular y ayuda en la formación de pectina; igualmente, el magnesio es el elemento central de la clorofila e importante enzima activador; y el azufre es componente de algunas proteínas y promueve el desarrollo de raíz (Sathyanarayana y Varghese, 2007; Yadav y Tyagi, 2006).

Los microelementos como el boro (B), zinc (Zn), magnesio (Mn), cobre (Cu), cobalto (Co), molibdeno (Mo), hierro (Fe), cloro (Cl) y yodo (I), son requeridos en pequeñas cantidades pero son esenciales para el crecimiento de células y tejidos. El hierro es considerado el más importante de los micronutrientes ya que es requerido en la síntesis de clorofila, en las conversiones de energía de la fotosíntesis y respiración, además de formar parte de proteínas (Yadav y Tyagi, 2006; Abdelnour y Escalant, 1994).

Según Trigiano y Gray (2005), el medio Murashige y Skoog (MS) es una mezcla de sales comúnmente usada, debido a que la mayoría de especies reaccionan favorablemente al ser cultivadas en este medio. La composición del medio MS se describe en la Tabla 1.

Compuestos	mg.L ⁻¹
Macronutrientes	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Micronutrientes	
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Hierro	
Na ₂ EDTA	37,3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8

Tabla 1. Formación de sales Murashige y Skoog (MS)

7.2.2.2 Componentes orgánicos

➤ Fuente de carbono

La sacarosa (20-60 g/l) es la fuente de carbono y energía comúnmente utilizada, la cual es esencial para el crecimiento y desarrollo del cultivo, ya que la mayoría de cultivos *in vitro* son incapaces de fotosintetizar de manera efectiva dado la insuficiente organización celular y desarrollo de tejidos, limitado intercambio gaseoso y las menos condiciones óptimas medioambientales otros tipos de azúcar utilizados como fuente de carbono son: glucosa, fructosa, maltosa, galactosa (Roca y Mroginski, 1991; Trigiano y Gray, 2005). Según Bhojwani y Razdan (1996), los azúcares son el principal componente osmótico del medio.

➤ Vitaminas, Aminoácidos y suplementos no definidos

Pequeñas cantidades de nutrientes orgánicos pueden mejorar el crecimiento y morfogénesis en plantas *in vitro*, estos pueden ser vitaminas, aminoácidos y suplementos no definidos. Las cantidades requeridas varían en función de la especie y genotipo (George *et al.*, 2008).

Las vitaminas son partes de enzimas o cofactores que interactúan en las funciones metabólicas. La tiamina, el ácido nicotínico, la piridoxina y el mioinositol son las vitaminas más frecuentemente utilizadas, aunque la tiamina (0,1-0,5 mg/l) es fundamental en un medio de cultivo ya que esta forma parte del metabolismo de los carbohidratos y la biosíntesis de algunos aminoácidos (George *et al.*, 2008; Trigiano y Gray, 2005).

Los suplementos no definidos tales como la caseína hidrolizada, agua de coco (5% a 15%, v/v), jugo de naranja, jugo de uva, puré de banana, extracto de levadura entre otros, son compuestos orgánicos complejos de los que se desconoce su composición específica, causando varias respuestas en los cultivos. Estos suplementos son fuente de nitrógeno, ácidos grasos, carbohidratos, vitaminas, reguladores de crecimiento, en diferentes concentraciones (George *et al.*, 2008; Trigiano y Gray, 2005).

7.2.3 AGENTES GELATINIZADORES

Según Roca y Mroginski (1991) la efectividad de un cultivo también está dado por el tipo y la concentración del agente gelatinizador. El cual permite al explante estar en contacto con el medio semisólido, ya sea en la superficie o incrustado; comúnmente se ha utilizado agar en un rango de concentración de 0,5% a 1,0% (w/v). La concentración utilizada puede ser crítica para la respuesta del cultivo, ya que en un medio bastante blando puede producir hiperhidricidad mientras que en un medio demasiado sólido puede causar reducción del crecimiento. El agar es un polisacárido, que consiste de agarosa y agarpectina, las cuales forman geles que contienen cantidades altas de agua (hasta 99,5%); entre otros beneficios, el agar no reacciona con ningún otro componente del medio y no es digerido por la enzimas de los tejidos vegetales (Trigiano y Gray 2005; Sathyanarayana y Varghese, 2007). Existen otros tipos de agentes gelificantes alternativos como agargel, transfergel, Phytigel, agarosa y gelrite (Mroginski *et al.*, 2010).

7.2.4 POTENCIAL DE HIDROGENO

El potencial de hidrogeno (pH) del medio de cultivo es esencial, generalmente se ajusta el medio a un pH entre 5,3 y 5,8. Valores superiores o inferiores al rango de pH de 4,5 a 7,0, el crecimiento *in vitro* de los explantes puede ser limitado debido probablemente a factores como la inestabilidad de reguladores de crecimiento, la precipitación de sales y iones, y cambios producido en la consistencia del agar, ya que un pH ácido (<4,5), el medio no se solidifica (Trigiano y Gray, 2005).

7.2.5 ESTAPAS DE LA PROPAGACIÓN *IN VITRO*

Según Trigiano y Gray (2005) las 5 etapas para una micropropagación exitosa son:

7.2.5.1 Etapa 0: Selección de la planta donadora y preparación

Los problemas asociados con la contaminación en la inoculación de los explantes primarios, su calidad y respuesta *in vitro* están directamente relacionados con las condiciones fisiológicas como fitosanitaria de la planta donadora (Trigiano y Gray, 2005), por lo que Pérez (1998) manifiesta que en la discriminación del material de partida se asegura una correcta selección individual.

7.2.5.2 Etapa 1: Establecimiento del cultivo aséptico

Es la etapa de iniciación, cuyo objetivo es alcanzar un cultivo axénico y fisiológicamente vigoroso Pérez (1998). Los contaminantes microbianos pueden afectar la sobrevivencia del explante, el crecimiento y la tasa de multiplicación, ya que en el medio de cultivo pueden crecer y competir ventajosamente con el explante (Roca y Mroginski, 1991; Trigiano y Gray, 2005).

➤ El explante

“Un buen explante es aquel cuyas células sobreviven, en una alta proporción, a la descomposición” causada por la desinfección, y “que luego responde eficientemente en las condiciones *in vitro*” (Roca y Mroginski, 1991, p. 130).

Su selección debe ser en base al sistema de propagación de la planta. En el caso de especies que se propaga vegetativamente Roca y Mroginski (1991) manifiesta que la fuente de explante pueden ser los brotes jóvenes y los ápices meristemático. El cultivo de meristemas, ápices caulinares y yemas axilares ha sido y es un buen método para obtener una rápida multiplicación clonal, además de mantener y multiplicar los materiales genéticos de las especies micropropagadas.

➤ La desinfección

La desinfección superficial del explante se realiza para evitar el crecimiento de microorganismos, primordialmente hongos y bacterias. Compuesto como: soluciones de hipoclorito de sodio y de calcio, peróxido de hidrogeno, nitrato de plata, alcohol, yodo, fungicidas, bactericidas, y otros han sido empleados para este proceso. En la tabla 2 se indican algunos de los químicos comúnmente utilizados y su efectividad en la esterilización superficial de los explantes descritos por Chawla (2004).

Agente esterilizante	Concentración utilizada	Facilidad de remoción	Tiempo de tratamiento (min)	Observaciones
Hipoclorito de sodio	1-1,4%	+++	5-30	Muy efectivo
Hipoclorito de calcio	9-10%	+++	5-30	Muy efectivo
Peróxido de hidrógeno	10-12%	+++++	5-15	Efectivo
Bromine wáter	1-2%	+++	2-10	Muy efectivo
Nitrato de plata	1%	+	5-30	Efectivo
Cloruro de mercurio	0,01-1%	+	2-10	Satisfactorio
Antibióticos	4-50mg/l	++	30-60	Efectivo

Tabla 2. Propiedades y comparación de esterilizantes superficiales comunes para explantes.

Las características del explante establecerán la concentración y el tiempo de exposición al compuesto (Roca y Mroginski, 1991), por ejemplo se ha observado que la desinfección para explantes tomados de plantas con ápices meristemático cubiertos, son más fáciles desinfectar que los explantes de plantas adulta, debido a que por lo general los meristemático cubiertos por hojas jóvenes están asépticos (Pérez, 1998).

7.2.5.3 Etapa 2: Multiplicación

La proliferación de brotes por partes de los explantes se pueden alcanzar con el uso de sustancias reguladoras de crecimiento como componentes de un medio de cultivo previamente establecido (Pérez, 1998). el crecimiento de brotes axilares se logra con la adición de citoquininas, sustancia que inhiben la dominancia del meristemo apical estimulado la formación de brotes axilares (Martínez y Pacheco, 2006; Mejía, 1994).

Para Trigiano y Gray (2005) el tipo y concentración de citoquinina debe ser en base de la tasa d multiplicación, la longitud de los brotes y la frecuencia de la variación genética que se quiera alcanzar, ya que altas concentraciones de citoquininas mejoran la proliferación de brotes, a pesar que los brotes producidos son usualmente más pequeños y puede presentar hiperhidricidad.

Además, las citoquininas en combinación de auxinas, en algunas especies, podrían o no aumentar la proliferación de brotes laterales. No obstante, otros efectos positivos ha sido mencionados con respecto a la adición de auxinas como la atenuación de la inhibición de las citoquininas sobre la elongación de los brotes, causando el incremento del número de brotes de suficiente tamaño para el enraizamiento (Trigiano y Gray, 2005).

7.2.5.4 Etapa 3: Enraizamiento

En la etapa de enraizamiento las plántulas deben crecer, desarrollar un seudotallo o tallo con las primeras hojas y formar raíces, ya que constituye una etapa de preparación y endurecimiento de los brotes para ser transferidos exitosamente a suelo e incrementar la sobrevivencia (Pérez, 1998; Trigiano y Gray, 2005).

En esta etapa deben manejarse factores como medios de cultivos simples (Pérez, 1998). Comúnmente en plantas herbáceas el enraizamiento puede ser obtenido en ausencia de reguladores, sin embargo en algunas especies leñosas la adición de una auxina es requerido en el medio para aumentar la eficiencia (Trigiano y Gray, 2005).

7.2.5.5 Etapa 4: Transferencia e medioambiente natural

Constituye la etapa de aclimatación, endurecimiento y trasplante en suelo en condiciones de invernadero o campo. Las condiciones de un cultivo *in vitro* son diferentes a las del medio ambiente natural, por lo que las plantas necesitan una etapa de aclimatación para adaptarse al nuevo habitat. En esta etapa se debe controlar

parámetros ambientales que permita disminuir la deshidratación y estimular la fotosíntesis en los cultivos (Mroginski *et al.*, 2010).

❖ Entre las ventajas de la micropropagación se pueden mencionar:

- Posibilita incrementar rápidamente nuevos materiales.
- Permite controlar las condiciones ambientales, debido a su independencia de los mismos (luz, temperatura y humedad controlada).
- Permite estudiar diversos procesos fisiológicos.
- Evita el riesgo de contaminación con patógenos, ya que se realiza en medios esterilizados.
- Se pueden obtener gran cantidad de individuos en espacios reducidos.
- Permite la obtención de individuos uniformes.
- Facilita el transporte del material.

7.3 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

La embriogénesis somática es la formación de un embrión a partir de una célula, sin la necesidad de la fusión de gametos. Esto no es un fenómeno artificial y es conocido en la naturaleza como una forma de apomixis llamada embrionía adventicia, descrita por primera vez por Strasburgues en 1878 aunque fueron Reinert y Steward en 1958 quienes dieron crédito por primera vez a la descripción de la embriogénesis somática.

Los embriones somáticos tienen, al igual que los cigótico, la capacidad de formar una nueva planta después de un proceso de germinación, con la diferencia que la embriogénesis somática es un proceso asexual por lo que la nueva planta será exactamente igual a la donadora de las células inicial.

Este método, teóricamente, es el más eficiente para la producción masiva de plantas *in vitro* debido a la naturaleza bipolar del embrión, la posibilidad de ser automatizado todo el proceso productivo, los altos coeficientes de multiplicación en cortos períodos de tiempo, al poder aplicarse los principios de la cinética microbiana y la posibilidad de encapsular estas estructuras y obtener semillas artificiales.

La embriogénesis somática fue descrita por primera vez en plantas de zanahoria (Steward *et al.*, 1958) cuando se observó el desarrollo de estructuras embriogénicas *in vitro*. Comenzando con el desarrollo globular de embriones somáticos que después se transformaron en embriones en estado de corazón, posteriormente en estado de torpedo y finalmente germinaron produciendo plantas fértiles. Los factores que afectan esta frecuencia de eventos fueron estudiados en detalles y optimizados, resultando protocolos con alta producción de embriones bien desarrollados. Debido a la perfección del protocolo, el cultivo en suspensión de células somáticas de zanahoria se usó como el modelo favorito en el estudio de mecanismos embriogénicos.

7.3.1 ORIGEN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Existen varias teorías acerca del origen unicelular o multicelular de los embriones somáticos. Algunas referencias señalan el incuestionable origen unicelular de los embriones en varios cultivos (Street y Withers, 1974; Haccius, 1977), pero también ha quedado claro que el embrión puede tener un origen multicelular (Williams y Maheswaran, 1986). Los factores que determinan si un embrión somático ha tenido un origen uni o multicelular no han sido dilucidados aún.

Una hipótesis es que el tejido con células somáticas determinadas preembriogénicamente da lugar a embriones con orígenes multicelulares y un tejido con células inducidas embriogénicamente da lugar a embriones con origen unicelular (Williams y Maheswaran, 1986), pero pueden ser encontradas suficientes excepciones dentro de esta teoría. Otra posible explicación puede ser que el embrión somático primario tenga un origen multicelular y posteriormente los embriones somáticos originados desde este embrión primario tengan un origen unicelular. Por ejemplo, Hartweek *et al.* (1988) encontraron embriones somáticos originados desde grupos de células en cotiledones de embriones cigóticos de *Glycine max* (L.) Merr (Soya). También Sato *et al.* (1993) en trabajos con soya hicieron referencia a la formación de embriones a partir de embriones somáticos en estado globular donde las nuevas estructuras se formaban a partir de una sola célula. Igual origen ha sido observado por Polito *et al.* (1989) durante la formación de embriones somáticos secundarios en la especie *Aleuritis* sp. L. (Nuez de nogal).

De manera general las células de las que se derivan los embriones somáticos muestran características comunes a las células en activa división, las cuales son de tamaño pequeño, citoplasma denso, núcleo grande con nucleolo prominente, vacuola pequeña y profusión de gránulos de almidón. Según William y Mahescuaran (1986) sus propiedades histoquímicas y ultraestructurales sugieren una intensa síntesis de ARN y actividad metabólica.

7.3.2 CARACTERÍSTICAS DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

La característica más distintiva de un embrión somático es que constituye un nuevo individuo con estructura bipolar (raíz y brote) capaz de originar una planta completa.

Según Sannasgala (1989) y Escalant y Teissont (1989) el embrión somático presenta las siguientes características:

- Es una estructura bipolar con un ápice radical, uno apical y cotiledones.
- Tiene autonomía frente al tejido generador (protegido generalmente por una epidermis). Histológicamente se plantea que no tiene conexión vascular con el tejido que le dio origen, por lo que pueden ser separados fácilmente de este.
- Presenta bandas procambiales entre los ápices.

Parrott (1993), afirmó que la inducción del estado embriogénico incluye la inducción de los mismos mecanismos genéticos que conllevan a la embriogénesis cigótica. Contrariamente a los embriones cigóticos, los embriones somáticos no contienen un nuevo grupo de genes, sino que poseen la misma combinación genética de la planta fuente del explante.

Evidentemente los procesos embriogénicos son afectados por una serie de factores que en algunos casos favorecen y en otros dificultan los manejos *in vitro* del material vegetal. Estos son los siguientes:

- El genotipo de la planta (Rodríguez – Otubo *et al.*, 2000).
- Las condiciones de cultivo (Bornhoff y Harst, 2000).
- Los reguladores del crecimiento y demás componentes del medio de cultivo (Perrin *et al.*, 2001).
- El tipo y estado fisiológico del explante (Fiore, 2002).

La naturaleza misma de la embriogénesis somática permite su aplicación en sistemas de cultivo líquido. Los mismos regeneran una mayor cantidad de material vegetal uniforme y el procedimiento es de gran valor para acelerar los métodos de mejoramiento genético clásico, pues permitirían lograr una multiplicación de variedades de híbridos intraespecíficos.

7.3.3 ASPECTOS MORFOLÓGICOS Y FISIOLÓGICOS DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.

7.3.3.1 Morfología de los embriones somático

En el caso de las dicotiledóneas, un embrión somático es morfológicamente similar a un embrión cigótico, sobre todo en su desarrollo evolutivo desde proembrión, fase globular, corazón, torpedo y fase cotiledonal o embrión maduro (Yasuda *et al.*, 2000).

En los estados iniciales, el suspensor está en menor desarrollo en embriones somáticos (puede ser quizás un reflejo de inutilidad bajo condiciones *in vitro*). Otra diferencia importante es que el embrión cigótico forma un eje embrional con el meristemo apical, preparándose para la dormancia. Mientras que el embrión somático no sufre disecación ni dormancia, así la embriogénesis somática se dirige a formar de una célula, una planta sin interrupción (Merckle, 1990).

Xu y Bewley (1992), con la ayuda de un microscopio eléctrico describieron los contrastantes patrones de desarrollo entre los embriones somático y cigótico, destacando un desarrollo lento en los estados tempranos y un desarrollo más rápido en los estados tardíos del embrión somático en comparación con los cigóticos; otra diferencia fue la falta de un suspensor bien definido y la formación de múltiples cotiledones mal desarrollados en embriones somáticos.

La embriogénesis somática es similar al desarrollo *in vitro* a partir del estado de torpedo. A partir de ese estado el desarrollo de embriogénesis somáticos, particularmente el desarrollo programado de los meristemas, sigue un camino que en un sentido muestra más analogía con la organogénesis.

7.3.3.2 Estructura de los embriones somáticos

Los embriones somáticos son estructuras bipolares que cuenta con un eje radical y otro apical, cotiledones, no poseen conexión vascular con el tejido materno y presentan

bandas procambiales entre los ápices (Zimmerman, 1993). Su desarrollo es nutrido por células vecinas a través de conexiones protoplasmáticas, estas estructuras bipolares son capas de crecer y formar plantas normales, debido a la naturaleza bipolar del embrión, es posible la alta velocidad de multiplicación (Escalant y Teissont, 1989; Sharp *et al.*, 1980; Zimmerman, 1993).

Yasuda *et al.* (2000) describieron en zanahoria inusual secuencia de estados morfológicos en la formación de embriones en estado de corazón a partir de masas preembriogénicas.

7.3.3.3 Dirección de la embriogénesis somática

La dirección de la embriogénesis es medida como epigenética: que es la distancia de las células del explante hasta el estado embriogénico. Se han clasificado a las células no embriogénicas como (CNEs) y a las células pre-embriogénicas o células determinadas a inducir embriogenia como (CEs).

Las CEs son epigenéticamente embriogénicas al explantarlas y son determinadas durante el ciclo mitótico celular, ejemplo: células de embriones cigóticos, en cambio las CNEs son el producto de un arranque epigenético del estado embriogénico en el medio de cultivo, se originan de células que reingresan al ciclo celular y se diferencian a CEs.

Los reguladores de crecimiento (auxinas y/o citocininas) son los agentes primarios que determinan a las CNEs, mientras en las CEs actúan como activadores del desarrollo. Una vez inducido las CNEs, funcionan equivalente a CEs y ambos pueden mantenerse y multiplicarse en el estado embrionario bajo condiciones apropiadas de cultivo, tales cultivos consisten de proembriones globulares o masas proembriogénicas proliferantes (MPEs).

➤ Embriogénesis somática directa

Esta ofrece la posibilidad de obtener embriones somáticos directamente desde células aisladas o grupos de células sin la formación de callo. Este desarrollo directo es debido a la acción realizada por la composición del medio de cultivo y el origen del explante.

La embriogénesis somática directa ofrece un número de aplicaciones potenciales, entre las que se pueden citar:

- Clonado directo de híbridos comerciales F1 para especies donde el material vegetal puede ser vendido como plantas jóvenes para trasplante a campo. El sistema ideal debe tener una embriogénesis continua directa desde los embriones sexuales F1 con un período de cosecha de los embriones somáticos obtenidos para lograr su crecimiento y desarrollo en plantas.
- Clonado rápido de un material vegetal (stock) de apreciado valor para el mejoramiento genético, en el estado más temprano posible de su ciclo de vida después del cruzamiento.
- Mejoramiento genético y selección *in vitro* de genotipos para diferentes caracteres de plantas completas en el estado más temprano posible de su ciclo de vida.

- Generación de plantas jóvenes de clones de especies fuera del mejoramiento genético donde cada semilla representa un genotipo diferente.
- Mecanización y automatización de la propagación clonal mediante el uso de Bioreactores.

➤ **Embriogénesis somática indirecta**

El fenómeno de la embriogénesis somática indirecta fue observado por primera vez en suspensiones celulares de zanahoria por Steward *et al.* (1958) y a partir de callos que crecían en medio de cultivo semisólido por Reinert (1958).

La embriogénesis somática indirecta ha sido descrita en especies como *Arachis hypogaea*, *Daucus carota*, *Papaver orientales*, *Vitis vinifera* (Blanckaert *et al.*, 2000) y *Musa spp* (Gómez *et al.*, 2002) por solo citar algunas.

Existen dos tipos de embriogénesis somática indirecta.

- ✓ Embriogénesis somática de baja frecuencia (ESBF): El número de callos con embriones somáticos es mayor, aunque se forman pocos embriones somáticos por callo. Estos embriones aparecen entre las 12 y las 14 semanas de cultivo, aislados o en pequeños grupos, y evolucionan completamente hasta las etapas avanzadas de desarrollo. En la segunda, los embriones somáticos aparecen entre las 16 y las 20 semanas de cultivo, no se desarrollan completamente y se mantienen en estado globular, agrupados en un número mucho mayor, aunque dichos grupos aparecen en un número menor de callos.
- ✓ Embriogénesis somática de alta frecuencia (ESAF): Es la presencia de un tejido embriogénico que se diferencia a partir de células individuales llamadas células embriogénicas madres. Otra característica general de estos sistemas es la aproximación secuencial durante las fases iniciales del cultivo, debido a la alta relación auxina/citoquinina durante la división celular y la baja relación entre estos componentes durante la fase de diferenciación (Söndahl *et al.*, 1991).

Otra forma de manifestarse la embriogénesis somática indirecta son los cultivos de suspensiones celulares embriogénicas. Estos son establecidos generalmente por la transferencia de fragmentos de callos indiferenciados o embriones somáticos en etapas iniciales a medio de cultivo en estado líquido. Estos posteriormente son colocados en agitación durante todo el período de cultivo. Este tipo de cultivo es un sistema modelo para estudiar las rutas de la producción de metabolitos secundarios, inducción de enzimas y expresión de genes y representa la base para el escalado del cultivo en los biorreactores.

Uno de los eventos iniciales para la inducción de la embriogénesis somática es la terminación de la salida del gen o los genes del patrón de expresión lo que permite su reemplazamiento con el programa de la embriogénesis. Un posible mecanismo para regular la baja expresión de los genes es la metilación del ADN, la cual ha sido

correlacionada con la cantidad de auxina exógena presente en el medio de cultivo; por lo cual tratamientos de estrés que permitan mantener baja la regulación de la expresión de los genes del tejido del explante, pueden también estimular la embriogénesis somática. Se han empleado diferentes técnicas tales como: estrés con calor, anaerobiosis, temperaturas bajas (4.0°C) y también la exposición a la auxina (Merkle *et al.*, 1995).

Las aplicaciones de inhibidores de la producción de etileno como los cationes cobalto (Co²⁺) y de los cationes de plata (Ag⁺) impiden la formación de los embriones. Los resultados obtenidos por Fuentes *et al.* (2000) indican que el etileno desempeña un papel importante en la regulación de la embriogénesis somática de *Coffea canephora* P.

Nomuna y Komamine (1995) plantearon una hipótesis en la que el nivel endógeno de auxinas provocaba la polaridad de la masa embriogénica, lo cual es indispensable para la inducción de la embriogénesis somática. Las auxinas añadidas exógenamente pueden cancelar la polaridad de la masa embriogénica al difundirse dentro de la misma, lo que induce la inhibición del proceso embriogénico iniciado por las auxinas endógenas, por lo que esta hipótesis postula que las auxinas juegan un doble rol. Las auxinas y específicamente el 2,4-D (2,4diclorofenoxiacético) es empleado por Puigderrajols *et al.* (2001) para inducir la embriogénesis somática en *Quercus suber* L.

La inducción de la embriogénesis somática activa rutas de control genético similares a las que presenta la embriogénesis cigótica, lo cual se puede considerar como un fenómeno universal para todas las plantas; sin embargo genotipos individuales dentro de una especie muestran capacidad embriogénica variada. Tales diferencias genotípicas en la capacidad embriogénica son el reflejo de diferencias en la activación de elementos importantes en la ruta embriogénica.

7.4 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.

7.4.1 GENOTIPO

Asumiendo que la inducción de la embriogénesis somática posiblemente involucra la activación de la misma ruta genética que la embriogénesis cigótica, la embriogénesis somática debe ser un fenómeno universal para todas las plantas que producen semillas. No obstante, genotipos individuales dentro de una especie pueden variar grandemente en su capacidad embriogénica. Tales diferencias de genotipo pueden deberse a la habilidad para activar elementos fundamentales en la ruta embriogénica (Merkle *et al.*, 1995).

Varios autores han reportado sobre la dependencia del genotipo (Ivanova *et al.*, 1994; Baker *et al.*, 1995; Jeannin *et al.*, 1995). Las respuestas embriogénicas también

pueden variar entre cultivares o entre individuos de un cultivar dado (Feirer y Simon, 1991).

Schoofs (1997) planteó que la facilidad con que se puede romper la dominancia apical de proliferaciones *in vitro* en el género *Musa* estaba correlacionada al porcentaje del cromosoma B en el genoma del cultivar. Dhed'a (1992) logró establecer suspensiones celulares de cinco cultivares, todos los cuales contienen por lo menos un conjunto de cromosoma B en su genoma. Como tal, puede concluirse que la inducción exitosa de la embriogénesis somática en el género *Musa* parece estar muy relacionada a la composición del genoma.

7.4.2 EXPLANTE

La selección del explante puede ser un factor fundamental que determina el fracaso o el éxito de un protocolo embriogénico (Brown *et al.*, 1995; Krishnaraj y Vasil, 1995). El explante más común para monocotiledóneas y dicotiledóneas es el embrión cigótico inmaduro, aunque, en las monocotiledóneas las células se diferencian rápidamente y pierden su totipotencia. La presencia de tejidos maduros y más diferenciados inhibe la expresión de la competencia embriogénica en las células.

Para células y tejidos determinados preembriogénicamente, el uso solo de citoquinina puede ser suficiente para inducir la embriogénesis somática, mientras que para células no embriogénicas o más diferenciadas, es necesaria una auxina o una auxina en combinación con una citoquinina (Schoofs, 1997).

La selección del mejor explante puede variar de especie a especie. No sólo el tipo de explante, sino también la edad, el estado de desarrollo y el nivel de diferenciación, parecen influenciar en la respuesta embriogénica. Ivanova *et al.* (1994) encontraron que los explantes de hojas en *Medicago falcata* son mejores cuando se toman de plantas con 30 días de edad, ya que en etapas más tardías los niveles de ácido indolacético (AIA) endógenos disminuyen significativamente. Altos niveles de AIA endógenos están correlacionados con una respuesta embriogénica rápida.

7.4.3 REGULADORES DE CRECIMIENTO

Los reguladores de crecimiento son moléculas orgánicas, capaces de actuar en las plantas en la expresión de genes, crecimiento y desarrollo, a concentraciones relativamente bajas de aproximadamente 0,01 mg/l. Se han identificado cinco grupos de reguladores de crecimiento: auxinas, citoquinina, giberelinas, etileno y ácido abscísico. Las clases más importantes usadas para regular el crecimiento y la morfogénesis es la auxinas (George *et al.*, 2008; Trigiano y Gray, 2005).

➤ Auxinas

El nombre auxina se deriva del griego *auxein*, que significa “aumentar” o “crecer” dado su función de elongación. Las auxinas pueden ser sintéticas como el ácido indolacético

(ANA), ácido dicloro fenoxiacético (2,4-D), o naturales como el ácido indolacético (AIA) y ácido indolbutírico (IBA). Las auxinas son reguladoras de crecimiento que se encargan de la elongación celular, dominancia apical, formación de raíces adventicias y embriogénesis somática; a concentraciones bajas, generalmente se ve favorecida la iniciación del enraizamiento y a concentraciones altas puede ocurrir la formación de callos. El IBA, AIA y ANA son usadas para enraizamiento y en interacción con una citoquinina para la proliferación de brotes, mientras que el 2,4-D es efectivo para la inducción y producción de callos. De todas las auxinas, el AIA es el menos estable, además usualmente es el menos efectivo que el ANA y 2,4-D. Las auxinas en combinación con citoquininas también promueven el crecimiento de callos y de células en suspensión. Generalmente, las monocotiledóneas requieren de concentraciones altas de 2,4-D en un rango de 10-50 μM para inducción de callos (Trigiano y Gray, 2005).

Las auxinas, naturales o sintéticas, son de bajo peso molecular y están estructuradas de un indol o un anillo aromático. El AIA es producido naturalmente en las plantas siendo su posible precursor el triptófano. Naturalmente, el AIA se sintetiza en los tejidos de rápido crecimiento y división, tales como meristemas apicales, hojas jóvenes, frutos en desarrollo y semillas. El movimiento de las auxinas en las plantas pueden ser por un transporte polar, el cual ocurre en las células del parénquima asociadas con el tejido vascular, y por el floema, transporte de forma no polar (Taiz y Zeiger, 2006).

Según George *et al.* (2008), las auxinas activan o controlan la degradación de proteínas represoras, a través de una vía dependiente de ubiquitina en la vía de ubiquitinación. La ubiquitina es una proteína que facilita la degradación de proteínas. De esta manera se explica el modo de acción de las auxinas de acuerdo a una regulación multifuncional en el desarrollo de la planta debido a la regulación positiva y negativa de genes que responden a auxina.

7.4.4 CONDICIONES DE CULTIVO

Las condiciones de temperatura e intensidad luminosa óptimas, ciertamente varían de especie a especie. McCain indujeron callos embriogénicos friables a partir de embriones inmaduros de maíz (*Zea mays*) en la oscuridad. Inflorescencias inmaduras fueron cultivadas en la oscuridad o a bajas intensidades luminosas en *Phoenix dactylifera* (Bhaskaran y Smith, 1992). Lazzetti *et al.* (1987) plantearon que los tubos fluorescentes GroLux®, que suministran más luz en el espectro rojo, pueden promover la formación de callos embriogénicos en soja (*Glycine max*).

7.5 ETAPAS DE LA EMBRIOGÈNES SOMÀTICA

7.5.1 INDUCCIÒN

Es el proceso por el que las células del explanto (porción de la planta donante cultivada *in vitro*) cambian su patrón de expresión y generan los embriones somáticos iniciales. Generalmente está condicionado por la presencia de reguladores del crecimiento en el medio de cultivo, fundamentalmente auxinas y citoquininas, pero se puede desencadenar, si el explanto es inmaduro, en ausencia de los mismos, tanto en angiospermas (Fernández- Guijarro, 1997) como en gimnospermas (Lelu *et al.*, 1999). En la mayoría de las especies la embriogénesis somática se obtiene a partir de embriones cigóticos inmaduros, lo que es sobre todo típico en coníferas (Klimaszewska y Cyr, 2002). Por ello, una de las limitaciones más importantes por el momento, es que se ha logrado en muy pocas especies la formación de embriones somáticos en tejidos procedentes de individuos adultos, y por tanto con posibilidades de ser seleccionados con fiabilidad. Para solventar este inconveniente, la estrategia que se sigue es producir líneas embriogénicas a partir de semillas procedentes de cruzamientos controlados, y crioconservar las mismas mientras se evalúan algunas plantas procedentes de las mismas en diferentes lugares de ensayo. El material crioconservado mantiene todo su potencial propagativo hasta completar la fase de evaluación.

Sin embargo, paulatinamente están empezando a publicarse trabajos que indican la posibilidad de obtener embriogénesis somática a partir de tejidos no embrionarios.

Así, por ejemplo, se puede inducir embriogénesis somática en hojas procedentes de plantas jóvenes de *Quercus suber* (Fernández-Guijarro *et al.*, 1994), de *Quercus rubra* (Rancillac *et al.*, 1996) y de *Quercus robur* (Cuenca *et al.*, 1999). Diferentes experimentos preliminares indicaron que se podían conseguir embriones somáticos a partir de hojas de alcornoques adultos (Fernández Guijarro, 1997; Toribio *et al.*, 2000). Recientemente se ha confirmado dicha posibilidad, clonando diferentes alcornoques seleccionados (Hernández *et al.*, 2003). Asimismo la posibilidad de lograr embriones somáticos a partir de hojas de árboles adultos se está empezando a extender a otras especies como olmo (Conde *et al.*, 2004) y roble (Toribio *et al.*, 2004), confirmando las posibilidades que había un antiguo trabajo en encina. También se puede lograr embriogénesis a partir de elementos florales (Merkle y Battle, 2000; Toribio *et al.*, 2000), pero en este caso hay que confirmar si se trata de embriogénesis somática o gamética. En algunas especies de coníferas se ha logrado la inducción de embriogénesis somática a partir de tejidos no embrionarios (Atree *et al.*, 1990; Ruaud *et al.*, 1992), pero las referencias sobre árboles adultos son todavía escasas, como la patente sobre *Pinus pinaster*, citada en Ramarosandratana *et al.* (1999), y la inducción en ápices vegetativos de árboles de 20 años en *Pinus radiata* (Smith, 1999) y de 15 años en *Pinus patula* (Malabadi y van Staden, 2005).

Uno de los aspectos fundamentales en la consecución de respuestas morfogénicas es la influencia del componente genético sobre las mismas, aspecto sobre el que a menudo no se incide suficientemente en las técnicas de cultivo *in vitro*. Sin embargo se ha comprobado en varias especies, y en coníferas en particular que, fundamentalmente sobre la inducción de embriogénesis somática, existe una influencia importante del

componente aditivo de la varianza genética (Park *et al.*, 1993; Park *et al.*, 1994), lo que permitiría efectuar una mejora genética sobre este carácter.

7.5.2 ESTABLECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN.

En la mayoría de los cultivos se emplean, como material de partida para el establecimiento de suspensiones celulares, callos con embriogénesis somática de alta frecuencia y/o embriones somáticos obtenidos, pero en etapas iniciales de desarrollo (Gómez, 1998). También puede lograrse a partir de: tallos, hojas, secciones de hipocótilos, pétalos, meristemos apicales, ovarios, embriones cigóticos, tubérculos, filamentos de anteras y fragmentos de cotiledones (Dennis *et al.*, 1993).

Además de las células embriogénicas, muy frecuentemente se encuentran células no embriogénicas en las suspensiones celulares (Dhed'a *et al.*, 1991). Nayak y Sen (1989) describieron las células de suspensiones de mijo que son ricas en almidón, como parcialmente embriogénicas, las cuales aún pueden ser transformadas en células embriogénicas bajo condiciones adecuadas. Estos autores encontraron también que tanto el intervalo de subcultivo como la temperatura de incubación, influyen en la frecuencia relativa de células embriogénicas.

Cuando las suspensiones celulares embriogénicas no son subcultivadas frecuentemente, la suspensión se torna mucilaginosas (Vasil y Vasil, 1982). Estas mismas observaciones fueron hechas en suspensiones celulares de *Musa* (Panis, 1995). Al llegar al tiempo de cultivo, estas pierden sus características embriogénicas, el color de la suspensión celular cambia, y las células son menos densas. Estudios histológicos revelaron la acumulación de almidón y vacuolación en células más viejas. Para evitar esto, el medio debe ser cambiado antes de llegar al fin de la fase exponencial de la curva de crecimiento (Schoofs, 1997). También la densidad celular tiene un impacto sobre la proliferación celular y el mantenimiento de las características embriogénicas. Los mejores resultados fueron obtenidos al ajustar la concentración de la suspensión a 1/3 de la densidad inicial.

Toonen *et al.* (1994) señalan que densidades celulares hasta 10 000 células/mL en zanahoria, son necesarias para inducir las divisiones celulares. Ho y Vasil (1983) hacen referencia a métodos de subcultivo que afectan la tasa de crecimiento de las células y la densidad de grupos de éstas en cultivos de la caña de azúcar.

7.5.3 FORMACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS.

Para inducir la formación de embriones a partir de masas proembriogénicas, las células embriogénicas pueden ser transferidas a un medio de cultivo con concentración de auxina más baja (Ho y Vasil, 1983), con menos auxinas activas (Hepher *et al.*, 1988; Liu *et al.*, 1993) o desprovisto de auxinas (Choudhary y Chin, 1995; Amarasinghe *et al.*, 1996).

Frecuentemente, los cultivos de células también son diluidos al ser transferidos al medio de cultivo para la inducción de embriones (Jansen *et al.*, 1990; Sterk *et al.*, 1991). Sung y Okimoto (1981) encontraron que la dilución y la eliminación de auxina son necesarias para el desarrollo normal del embrión.

Las auxinas (a concentraciones más altas) no bloquean la formación temprana del embrión, ya que la embriogénesis directa ocurre en la presencia de auxinas. La auxina, sin embargo, bloquea el desarrollo del embrión más allá de cierta etapa y frecuentemente evita la transición de la etapa globular a corazón (Schoofs, 1997).

7.5.4 GERMINACIÓN Y CONVERSIÓN DE LOS EMBRIONES SOMÁTICOS EN PLANTAS.

La germinación es muy importante en el proceso de la embriogénesis somática y es diferente de la conversión. La germinación se refiere al desarrollo de la raíz y/o brote, mientras que la conversión se define por Stuart y Strickland como la supervivencia y desarrollo en fase de propágulo en condiciones ambientales *ex vitro*, o sea, en suelo. La habilidad de obtener *in vitro* plantas con raíces no es necesariamente un indicador de continuo crecimiento y vigor en condiciones *ex vitro* (Fuji *et al.*, 1990).

7.6 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Las proteínas son las moléculas orgánicas más abundantes en la célula, ellas constituyen más del 50% del peso seco de la célula. Cada tipo celular, tiene un rol específico determinado por su composición proteica. Con la posibilidad de que 20 (o 22) aminoácidos diferentes puedan estar unidos en cualquier orden para conformar polipéptidos de cientos de aminoácidos, tienen el extraordinario potencial de producir una gran cantidad de variantes en su conformación. Esta variedad genera funciones tan refinadas como las de las enzimas que están involucradas en el metabolismo celular. Una bacteria puede tener cerca de 1000 proteínas diferentes, en una célula humana puede haber más de 10.000 clases de proteínas distintas.

La composición protéica de las células en un determinado momento depende del conjunto de genes que se estén activando y esto está relacionado directamente con las señales que recibe la célula, de su micro ambiente y de las características celulares que le son propias. Es decir que el patrón proteico de una célula vegetal será distinto al de una célula animal, una célula hepática de un ratón, será distinta de una célula hepática de un humano, y a su vez una célula hepática de ratón será distinta a una neurona del mismo animal

La expresión de proteínas puede estudiarse por ejemplo, mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida (TP N°3). Para esto es necesario extraer primero las proteínas a partir de las células que constituyen los tejidos u órganos. Al momento de elegir el protocolo a seguir para obtener el extracto crudo, es importante tener en cuenta tanto el material de partida como su posterior utilización:

Material biológico de partida-tipo de organismo: En el caso de órganos u otros tejidos animales, es necesario disgregarlos antes de proceder a la lisis celular, ya que las células se encuentran rodeadas de tejido conectivo. En general estas técnicas involucran la utilización de enzimas (como por ejemplo colagenasa) y/o una ruptura mecánica grosera. Para esto pueden utilizarse morteros, homogeneizadores eléctricos, tijeras o tamices metálicos (*mesh*), entre otros.

Cuando el material es un cultivo celular, la extracción puede realizarse adicionando un detergente, realizando un shock osmótico, o por sonicación.

Finalidad del extracto proteico: esto determinará el buffer de extracción que se utilizará dependiendo se desea o no que las proteínas conserven su actividad biológica, su conformación nativa, su interacción con otras proteínas u otras moléculas. Algunos protocolos son tan violentos que involucran la ruptura de todas las membranas; otros en cambio permiten fraccionar y obtener, distintos componentes subcelulares (núcleos, mitocondrias, etc).

La extracción de proteínas celulares comienza siempre con una ruptura celular o **lisis**. Los métodos más utilizados se basan esencialmente en la homogenización de los tejidos y la destrucción de los límites celulares por medio de diferentes procedimientos físicos y/o químicos.

Obteniéndose lo que se denomina extracto crudo. Los objetivos a lograr en esta etapa son maximizar la liberación de las proteínas de interés, evitando la degradación térmica o las alteraciones secundarias por oxidación, proteólisis, etc. Se han desarrollado una amplia gama de técnicas de disrupción celular, que se usan a escala de laboratorio que se pueden clasificar como:

- a) Métodos físicos mecánicos: agitación con abrasivos, homogeneización a alta presión o extrusión por presión.
- b) Métodos físicos no mecánicos: shock osmótico, ciclos de congelación descongelación, sonicación o secado.
- c) Métodos químicos: tratamiento con álcali, solventes, detergentes, ácidos o sustancias caotrópicas

Luego de la lisis, suelen aplicarse sucesivos pasos de separación y purificación de los componentes celulares. Como primera medida, puede realizarse una **centrifugación diferencial** para obtener fracciones subcelulares o para aislar organelas específicas. En este caso, las proteínas asociadas a membrana quedarán en el *pellet* (precipitado que queda en el fondo del tubo luego de una centrifugación) y las solubles en el sobrenadante.

En general, el extracto obtenido es sometido a tratamientos que separan las proteínas en diferentes fracciones basados en algunas propiedades tales como tamaño o carga, proceso denominado *fraccionamiento*. Las primeras fases en este proceso suelen utilizar diferencias en la **solubilidad de las proteínas**.

Existen diversos factores que afectan esta solubilidad; en particular, la composición en aminoácidos (una proteína rica en aminoácidos polares es en general más soluble que una rica en aminoácidos hidrofóbicos); la estructura tridimensional (las proteínas fibrosas son en general menos solubles que las globulares) y el entorno de la propia proteína. Respecto a las condiciones del entorno de las proteínas, los principales factores que pueden afectar su solubilidad son la temperatura; la constante dieléctrica del medio; el pH del mismo; y la fuerza iónica.

La **precipitación salina** de las proteínas es una técnica en donde se logra la precipitación de una fracción de proteínas mediante el aumento de la fuerza iónica del medio. Grandes cantidades de una sal agregada a una solución de proteínas, disminuye la interacción proteína- H₂O porque quita la capa de solvatación, predominando la interacción proteína-proteína y generando la precipitación de las

mismas. La concentración salina a la que se produce la precipitación no es igual para todas las proteínas, lo que permite usar ésta propiedad para la separación y purificación de proteínas particulares a partir de mezclas complejas. Comúnmente se usa sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para tal fin, a causa de su gran solubilidad (760 g de sulfato de amonio/1000 ml. de agua a una temperatura de 20°C) y porque el ión sulfato divalente permite alcanzar altas fuerzas iónicas. La adición gradual de ésta sal permite el fraccionamiento de una mezcla de proteínas, las cuales son precipitadas pero no desnaturalizadas. La cantidad de proteínas en la muestra analizada puede estimarse por diversos métodos.

La mayoría de las proteínas absorben a **280 nm**, y a bajas concentraciones, lo hacen de manera proporcional con su concentración. Este es un método rápido y sencillo pero tiene la desventaja es que la muestra debe estar pura, ya que otras moléculas no-proteicas como el DNA, también absorben a esa longitud de onda. Por otro lado, los **ensayos colorimétricos** involucran la adición de una sustancia química que es capaz de reaccionar con determinados residuos aminoacídicos.

El resultado de estas reacciones es el cambio de color en la solución, que es cuantificado mediante una medida de absorbancia. En general, estos métodos son más sensibles que la cuantificación por absorbancia directa a 280 nm. Posteriormente, para determinar la concentración de proteínas totales de la muestra a analizar los resultados de absorbancia se interpola a un curva de calibración construida utilizando una proteína estándar, por lo general albúmina sérica bovina (*BSA bovine seric albumin*), cuya concentración es conocida.

Los ensayos colorimétricos más utilizados son:

Ensayo de Bradford (595nm): es uno de los más sensibles. Es rápido y muy sencillo y además no presenta interferencia con sustancias reductoras como el DTT y el β -mercaptoetanol, que sí interfieren con Los ensayos de Lowry y BCA. La desventaja es que es altamente sensible a detergentes y lípidos.

Ensayo de Lowry (750 nm): se trata de una reacción de redox con los enlaces peptídicos y con los laminoácidos Tyr, Trp y Cys. Es rápido, sencillo y relativamente sensible. Como desventaja, es afectado por un amplio rango de compuestos no proteicos como EDTA, sulfato de amonio, Tritón X-100. Sin embargo existen variables que pueden realizarse para evitar estas interferencias, que están disponibles comercialmente.

7.7 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

Las proteínas son moléculas cuya carga neta depende del contenido de una serie de aminoácidos (fundamentalmente ácido glutámico, ácido aspártico, lisina, arginina e histidina) y del grado de ionización de éstos al pH considerado (figura 1).

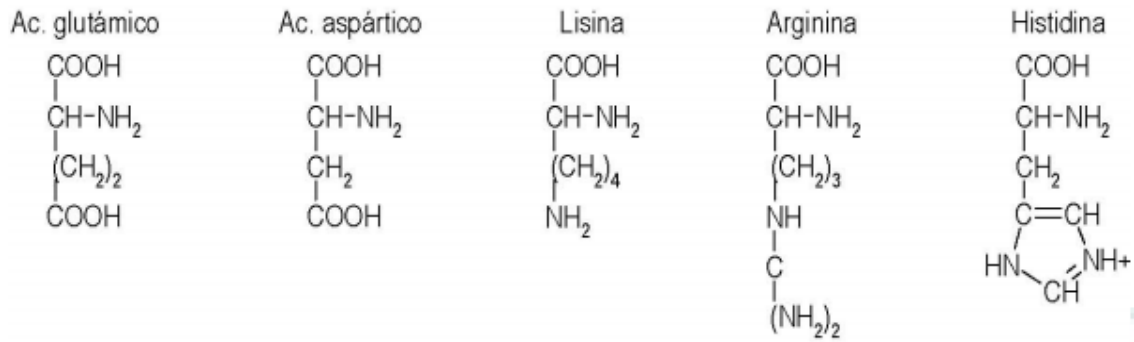


Figura 1. Principales aminoácidos responsables de la carga neta de una proteína, dependiendo del pH.

La electroforesis es un método analítico en el que se utiliza una corriente eléctrica controlada con la finalidad de separar biomoléculas según su relación tamaño a carga eléctrica, usándose como base una matriz gelatinosa.

Cuando una mezcla de moléculas ionizadas y con carga neta son posicionadas en un campo eléctrico, estas experimentan una fuerza de atracción hacia el polo que posee carga opuesta, dejando transcurrir cierto tiempo las moléculas cargadas positivamente se desplazarán hacia el cátodo (polo negativo) y aquellas cargadas negativamente se desplazarán hacia el ánodo (polo positivo) Figura 2.

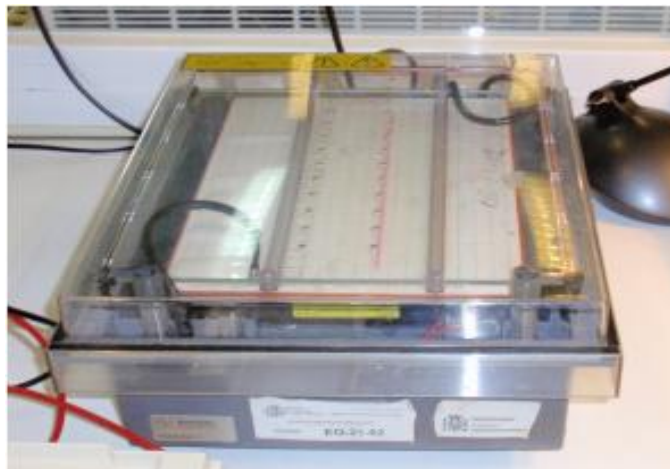


Figura 2. Electroforesis

El soporte sobre el que tiene lugar el desplazamiento de las especies es un gel de poliacrilamida, este tipo de análisis se caracteriza porque:

- La migración es proporcional a la carga neta, el tamaño y la forma de la proteína.
- Los geles son químicamente inertes, transparentes y estables en un amplio rango de pHs, temperatura y fuerza iónica.
- Los geles de poliacrilamida (PAGE) se forman por la polimerización de la acrilamida por acción de un agente entrecruzador, la bis-acrilamida, en presencia de un iniciador (TEMED (N, N, N, N'-tetrametilnediamina) y como

catalizador el ión persulfato ($S_2O_8^{2-}$), que se añade en forma de persulfato amónico.

- En función del estado de las proteínas (nativo o desnaturalización) a lo largo del proceso electroforético, éstas se clasifican en electroforesis nativas o desnaturalizantes:
 - **En una electroforesis desnaturalizante:** es la que somete a las proteínas a migración asegurando la completa desnaturalización (pérdida de la estructura tridimensional). En esta situación la migración es proporcional a la carga y al tamaño de la molécula pero no a su forma.
 - **En una electroforesis nativa:** a las proteínas se les somete a una migración sin desnaturalización. En esta situación las proteínas migran en función de su carga, de su tamaño y de su forma. Además se mantienen en ciertos casos las interacciones entre subunidades y entre proteínas, separándose los complejos.

Los tipos de electroforesis, usadas en el Laboratorio Control de Dopaje son:

- ✓ Electroforesis en geles de poliacrilamida por Isoelectroenfoque (IEF-PAGE) (Figura 3)
- ✓ Electroforesis en geles de poliacrilamida por SDS-PAGE. (Figura 4)



Figura 3. Análisis por IEF

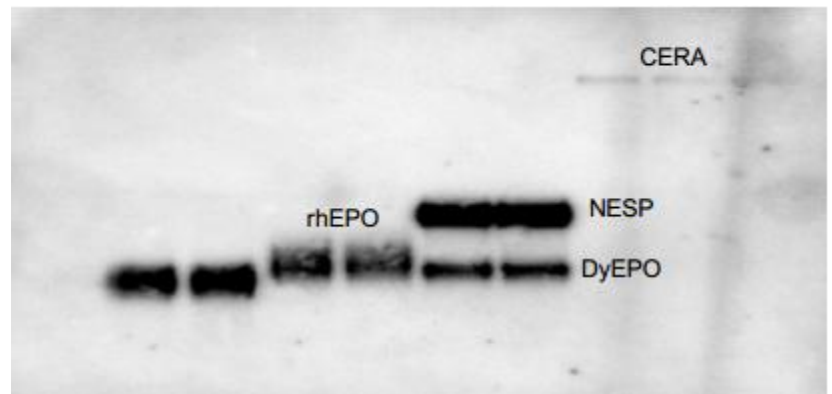


Figura 4. Análisis por SDS-PAGE

El uso de la electroforesis por IEF-PAGE está limitado a moléculas que pueden estar cargadas positivas o negativamente. Proteínas, enzimas y péptidos son moléculas anfóteras. La carga neta de una proteína es la suma de todas las cargas positivas y negativas de la cadena lateral de aminoácidos, pero la configuración de la proteína también juega un papel. Para proteínas tales como glyco- o nucleoproteínas, la carga neta está también influenciada por el azúcar o por el grupo funcional del ácido nucleico. La degradación de la fosforilación también tiene una influencia sobre la carga neta. El Isoelectroenfoque es uno de los mejores procedimientos para el aislamiento de proteínas.

El análisis por electroforesis con SDS, se trata de un tipo de electroforesis desnaturante en la que las muestras se desnaturan por calor en presencia de agentes desnaturantes (beta-mercaptoetanol, que destruye los puentes disulfuro, SDS que desnaturiza y recubre a la proteína), y se separan como cadenas polipeptídicas aisladas. El SDS es un detergente de acción desnaturante que se une a las cadenas polipeptídicas desnaturadas con una relación de 1,4g de SDS por gramo de proteína, uniéndose una molécula de SDS por cada dos aminoácidos de la cadena. Ésta unión masiva de moléculas de SDS bloquea la carga propia de la molécula de proteína y le confiere al complejo una carga neta negativa proporcional a su masa, haciendo que todas las proteínas acoplejadas con SDS viajen hacia el ánodo.

7.8 ESPECTROMETRÍA DE MASAS

El espectrómetro de masas es un aparato que se basa fundamentalmente en el movimiento de partículas cargadas en un campo magnético; y en modo de materia se define como: “Método de análisis basados en el estudio detallado de los iones que se forman al suministrar energía a una molécula”.

La espectrometría de masas es una poderosa técnica microanalítica que se usa para identificar compuestos desconocidos, para cuantificar compuestos desconocidos, para elucidar la estructura y propiedades químicas de moléculas o para determinar el contenido isotópico de diferentes elementos en un mismo compuesto. La detección de los compuestos es regularmente llevada a cabo con cantidades realmente pequeñas de sustancias y así obtener información característica como el peso y algunas veces la estructura.

Un espectrometría de masas es un ejemplo del movimiento de partículas cargadas en un campo magnético.

Componentes principales de un espectrómetro de masa

Existen muchas técnicas de ionización de muestras, que se adecuan a los distintos tipos de sustancias, pero un espectrómetro de masa en general se compone de:

- Sistema de bombeo
- Sistema de entrada
- Fuentes de iones (cámara de ionización)
- Óptica iónica
- Analizador másico
- Detector
- Línea de transferencia (CG-EM)
- Como los iones son inestables y muy reactivos se deben manipular en alto vacío (SISTEMA DE BOMBEO).

En todas las mediciones, alguna forma de energía es suministrada a las moléculas a analizar para perturbar la ionización, existen distintas técnicas de ionización como las: FAB y MALDIN que son más adecuadas para sustancias poco volátiles, inestables o de peso molecular alto (proteínas, polisacáridos), pero para molecular de polaridad más bajas o media de hasta peso molecular 500 la técnica de ionización mas utilizada es la del impacto electrónico (EI). En la técnica tradicional de impacto electrónico (electrón ionization EI), algunas de las moléculas ionizadas del compuesto o muestra en estado gaseoso, son golpeadas por un haz de electrones de alta energía, estas “explotan” en una variedad de fragmentos ionizados, el patrón de fragmentación resultante así como los iones residuales constituyen el espectro de masas.

✚ Ventajas de la espectrometría de masa

- 1.- Capacidad de identificación (desde átomos a moléculas muy complejas)
- 2.- Es cualitativa y cuantitativa
 - Huella dactilar de nuestra sustancia
 - Medir (sustancia) (concentración de la sustancia)
- 3.- Permite analizar mezclas complejas
- 4.- posee una gran sensibilidad: (concentración) de ppq (partes por cuatrillón).
- 5.- Es universal y específica (muestras solidas, liquidas o gaseosas).
- 6.- Permite determinar el peso molecular de la sustancia analizada.
- 7.- Suministra información estructural de la molécula analizada.
- 8.- Suministra información isotópica.
- 9.- Es muy rápida (espectro en decimas de segundo).
- 10.- Técnica en fin muy evolucionada y automatizada.

8.- PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS

8.1 MULTIPLICACIÓN Y CRECIMIENTO DE CALLOGÉNESIS DE EXPLANTES *IN VITRO* *Agave americana* L.

8.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Para desarrollar el presente trabajo experimental se utilizó como material vegetal, plantas *in vitro* del *Agave americana* L. con edad de un año aproximadamente, con una altura de 2 a 5 cm que se encuentran sembrados en frascos de 5.5 x 6.8 cm con medio MS para establecimiento debidamente tapados, provenientes del laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez Chiapas.



Figura 1. Plantas *in vitro* de *Agave americana* L.

8.1.2 MEDIO DE CULTIVO UTILIZADO

Se utilizó el medio MS (Tabla 1), con un pH ajustado a 5.7, agregando HCL (10%) o NaOH (10%) según fue necesario.

Componentes	1 Ltr
Macroelementos	100 ml
Microelementos	10 ml
Quelatos	10 ml
Vitaminas	10 ml/L
Mio-inositol	100 mg/L
NaH ₂ PO ₄	50 mg/ L
Sacarosa	30 g/L
Phytigel	2.5 g/L
MS	4.4 g/L

Tabla 1. Componentes del Medio MS para cultivo de tejidos vegetales.

Se utilizaron frascos de cristal con tapa de plástico, previamente lavados y esterilizados al igual que los instrumentos de disección y otros materiales de vidrio en autoclave a 121 °C a 15 Lb de presión durante 15 min. En cada frasco se depositó 15 ml de MS para establecimiento y fueron esterilizados nuevamente en autoclave en las mismas condiciones anteriores.

Los frascos con el medio MS se incubaron en el cuarto de aclimatización en condiciones de iluminación constantes, bajo lámparas de luz blanca fluorescente de 2000 lux. Con una humedad relativa de 80-90 % y una temperatura constante de 18 °C, y fueron revisadas diariamente para detectar que no hubiera presencia de contaminación durante siete días.

8.1.3 MULTIPLICACION DE LOS EXPLANTES

Para multiplicar los explantes se tomaron de la cámara de aclimatización frascos que contienen explantes *in vitro* de *Agave americana* L. y frascos que contiene el medio MS llevándolo a la cámara de flujo laminar, con los instrumentos de disección y material de vidrio (esterilizados) para preservar la esterilidad de las muestras.

8.1.3.1 Inducción de los explantes

Los explantes de *Agave americana* L. introducidos a la cámara de flujo laminar no presentaron contaminación microbiana, oxidación y vitrificación los cuales fueron

utilizados en la etapa de multiplicación (5 frascos). Las plántulas se separaron del callo mediante el uso de fuerza mecánica producida con pinzas, en los casos en los que no se pudieran obtener separar el callo con pinzas, se utilizaba un bisturí (mango Nro. 7) para producir un corte en el callo sin dañar la plántula.

Los explantes fueron cultivados en frascos que contienen el medio MS para establecimiento se taparon y se sellaron para finalmente incubarlos nuevamente en el cuarto de aclimatización.

8.1.4 INDUCCIÓN DE CALLOGÉNESIS

Para la inducción de callos se utilizó como explante las hojas de la planta *in vitro* *Agave americana* L. (Figura 1) con 35 días de establecimiento que se encontraban en el cuarto de aclimatización.



Figura 1. Plantas *in vitro* *Agave americana* L.

Se utilizo como medio de cultivo MS para establecimiento con auxina 2,4-D (con concentraciones de 0.5 mg/L, 1 mg/L y 2 mg/L) el cual fue esterilizado en autoclave a 121 °C a 15 Lb de presión durante 15 min, en donde el cultivo se vació en cajas Petri en la cámara de flujo laminar.

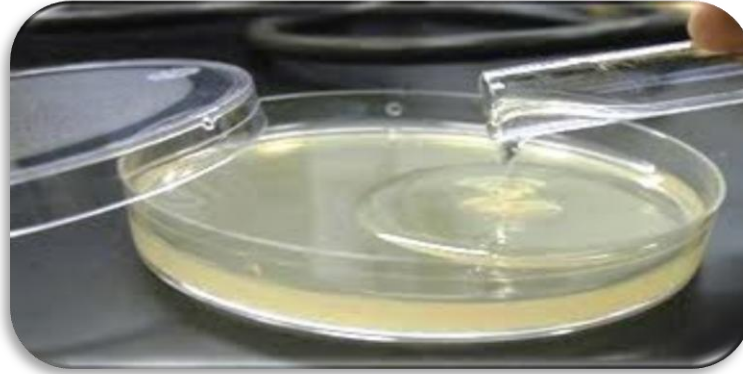


Figura 2. Medio de cultivo MS con auxina 2,4-D.

Los explantes *in vitro* *Agave américa* L. fueron colocadas en las cajas Petri el cual contiene el medio MS con auxina 2,4-D (con tres concentraciones) para la inducción de callos. El procedimiento fue realizado bajo condiciones de la cámara de flujo laminar donde se eliminó la capa de celulosa de la parte inferior de la hoja mediante el raspado con bisturí (mango Nro. 7), pinzas estériles, mechero y posteriormente se sellaron como se muestra en la (Figura 3).



Figura 3. Explantes *in vitro* *Agave americana* L. en cajas Petri.

Los explantes que se encuentran en las cajas Petri fueron colocadas en cajas para mantenerlas en condiciones de oscuridad he incubadas a una temperatura de 18 °C en el cuarto de aclimatización. Las muestras permanecieron de 4 a 6 semanas para la presencia de inducción callogénesis y revisadas diariamente para detectar presencia de contaminación (Figura 4).



Figura 4. Explantes *in vitro* *Agave americana* L. en cajas Petri.

9.- RESULTADOS Y DISCUSIONES

9.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis de Varianza (ANOVA) simple y la prueba de Diferencia Mínima Significativa (DMS) con un nivel de significancia $P < 0.05$ utilizando el Software STATGRAPHIS Centurión XV).

9.2 PORCENTAJE DE FORMACIÓN DE CALLOS CON EL FACTOR 2,4-D.

El factor analizado fue el 2,4-D con 3 diferentes concentraciones de 0.5 mg/L, 1.0 mg/L y 2.0 mg/L, teniendo como variable de respuesta la generación de callo. El **Cuadro 1** muestra el porcentaje de formación de callo en donde se obtuvo un 91% como valor máximo y un 25% como mínimo a 0.5 y 2 mg/L respectivamente, este cuadro también refleja un coeficiente de variación elevado por resultado de un rango de resultados que va desde 0 a 3 callos por explante.

2,4-D	% de formación de callo	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación (%)	Mínimo	Máximo	Rango
0.5	91	1.08	118.21	0.0	3.0	3.0
1.0	54	0.78	144.39	0.0	2.0	2.0
2.0	25	0.45	180.90	0.0	1.0	1.0
Total	56	0.83	147.15	0.0	3.0	3.0

Cuadro 1: Resumen Estadístico para callos, n=12

9.3 EXPLANTES QUE PRESENTARON GENERACIÓN DE TEJIDO CALLOSO.

En el **Cuadro 2** se muestra el ANOVA para la formación de callo de cada uno de los 3 niveles de 2,4-D. La intención principal del análisis de varianza de un factor es la de comparar las medias de los diferentes niveles observando en esta investigación una alta variabilidad entre los resultados de un mismo grupo ya que algunos explantes presentaron generación de tejido calloso hasta en 3 diferentes puntos mientras que en otros explantes del mismo tratamiento no se obtuvo tejido calloso. En el mismo cuadro se expresa la razón-F, que en este caso es igual a 2.02, puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de callos entre una concentración de 2,4-D y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2.68056	2	1.34028	2.02	0.1487
Intra grupos	21.8958	33	0.66351		
Total (Corr.)	24.5764	35			

Cuadro 2. ANOVA para callos por 2,4-D

9.4 MUESTRAS DE LA MEDIA DE CALLOS PARA CADA CONCENTRACION DE 2,4-D.

En el **Cuadro 3** se muestra la media de callos para cada concentración de 2,4-D y utiliza la prueba de diferencia mínima significativa para determinar si existe o no, con un 95% de confianza. Letras o símbolos iguales identifican a un grupo homogéneo en el que no existe una diferencia mínima significativa entre las concentraciones utilizadas, posiblemente desde la concentración más baja hasta la más alta utilizada en esta investigación fueron suficientes para generar callos.

2,4-D	Casos	Media	Grupos Homogéneos
2.0	12	0.25	X
1.0	12	0.541667	X
0.5	12	0.916667	X

Cuadro 3. Prueba de diferencia mínima significativa.

El que no exista diferencia estadística entre las 3 concentraciones utilizadas nos da como resultado que una concentración de 0.5 mg/L de 2,4-D es suficiente para inducir callogénesis de igual manera que 1 o 2 mg/L, lo cual puede ser resultado de una sensibilidad alta ante la presencia de esta auxina. Una alta sensibilidad al 2,4-D por parte del género *Agave* ha sido reportado anteriormente en otros trabajos como los de Valenzuela-Sánchez en *A. tequilana* con obtención de brotes utilizando 0.25 mg/L de 2,4-D, Powers & Backhaus (1989) en *A. arizonica* (0.3mg/L), 0.1 mg/L para *A. cantala*, *A. fourcroydes* y *A. sisalana* (Bihn, 1990), 0.5 mg/L en *A. amaniensis* (Andrijany, 1990) así como también en *A. victoria-reginae* (Martinez-palacios, 2003), Nikam (2003) utilizo de 0.5-1 mg/L en *A. sisalana* mientras que Tejavathi (2007) lo hizo con 1 mg/l en *A. vera-cruz*. Todos estos resultados soportan los resultados obtenidos en esta investigación en donde a relativamente bajas concentraciones de la auxina, se obtiene tejido calloso en un alto porcentaje.

10.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se logro evaluar el efecto de tres diferentes concentraciones de 2,4-D, obteniendo callos en un periodo de 8 semanas y se comprobó que las hojas jóvenes de plántulas in vitro son la mejor opción para producir callogénesis, estando ya esterilizadas y no tener que pasar por una fase agresiva de desinfección.

Se pudo comprobar que una concentración mínima de 0.5 mg/L de 2,4-D en las plántulas de *agave americana* es suficiente para inducir callogénesis, en la misma medida que lo harían concentraciones más altas de 2,4-D.

En el presente trabajo demostró que son muy eficaz utilizar la propagación in vitro en plántulas, utilizando auxinas de crecimiento (2,4-D) obteniendo buenos resultados para el crecimiento de callo.

No es necesario utilizar grandes concentraciones de auxinas (reguladoras de crecimiento) para obtener un buen crecimiento de callos, debido a que con una concentración mínima de 0.5mg/L se observa la presencia de callogénesis.

El cultivo *in-vitro* se puede considerar como una técnica apropiada para la inducción de callos, sin embargo, es un proceso del cual se requiere de mucho tiempo para alcanza un buen crecimiento.

Es de suma importancia implementar una manera la cual nos permita ahorrar tiempo en el proceso de crecimiento, una manera de hacerlo es hacer uso de los biorreactores RITA para embriogénesis somática.

10.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdelnour-Esquivel, A., Escalant J. V. (1994). Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. CATIE.

Amarasinghe V., Dhami R., Carlson J.E. 1996. Polyamine biosynthesis during somatic embryogenesis in interior spruce (*Picea glauca* x *Picea engelmannii* complex). Plant Cell Reports 15, 495-499.

ATTREE S.M., BUDIMIR S., FOWKE L.C., 1990. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured shoots and cotyledons of seedlings from stored seeds of black and white spruce *Picea mariana* and *Picea glauca*. Can J Bot 68, 30-34.

Baker C.M., Durham R.E., Burns J.A., Parrott W.A., Wetzstein H.Y. 1995. High frequency somatic embryogenesis in peanut (*Arachis hypogaea* L.) using mature, dry seed. Plant Cell Reports 15, 38-42.

Bhojwani, S. & Razdan, M. (1996). Plant tissue culture: theory and practice (Revised edition). The Netherlands: Elsevier.

Bornhoff, BA y Harst M (2000) Establishment of embryo suspension cultures of grapevines (*Vitis* L.). Vitis 39: 27-29

Bhaskaran S., Smith R.H. 1992. Somatic embryogenesis from shoot tip and immature inflorescence of *Phoenix dactylifera* cv. Barhee. Plant Cell Reports 12, 22-25.

Blanckacrt, A, Belingheri A, Vasseur J y Hilbert J (2000) Changes in lipid composition during somatic embryogenesis in leaves of *Cichorium*. Plant Science 157: 165-172

Brown D.C.W., Finstad K.I., Watson E.M. 1995. Somatic embryogenesis in Herbaceous Dicots. En: Thorpe T.A. (Ed) *In vitro* embryogenesis in plant. London: Kluwer Academic Publishers pp. 345-415.

Chawla, H. (2004). Introduction to plant biotechnology (2da. Ed.) Enfield (NH): Science Publishers, Inc.

CONDE P., LOUREIRO J., SANTOS C., 2004. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Ulmus minor* Mill. Plant Cell Rep 22, 632-639.

CUENCA B., SAN-JOSÉ M.C., MARTÍNEZ M.T., BALLESTER A., VIEITEZ A.M., 1999. Somatic embryogenesis from stem and leaf explants of *Quercus robur* L. Plant Cell Rep 18, 538-543.

Choudhary M.L., Chin C.K. 1995. Somatic embryogenesis in cell suspension culture of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). Plant Growth Regulation 16, 1-4.

Chugh A, Khurana P (2002) Gene expression during somatic embryogenesis recent advances. Current Science. 83 (6): 715-739.

Dennis J., Trigiano N., Conger V. 1993. Liquid suspension culture production of Orchard grass somatic embryos and their potential for the breeding of improved varieties. En: Redenbaugh K.

- (Ed) Synseeds applications of synthetic seeds to crop improvement, pp. 351-365. Calgene Inc. Daris, California.
- Dhed'a D., Dumortier F., Panis B., Vuylsteke D., De Langhe E. 1991. Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv. 'Bluggoe' (*Musa* sp. ABB group). *Fruits* 46, 125-135.
- Dodeman VL, Ducreux G, Kreis M (1997) Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *J Exp Bot* 48:1493–1509.
- Dhed'a D. 1992. Culture de suspensions cellulaires embryogéniques et regeneration en plantules par embryogénese somatique chez le bananier et le bananier plantain (*Musa* spp.), Ph.D. Thesis, K.U. Leuven, Belgium p. 171.
- Escalant, J y Teissant C (1989) Somatic embryogenesis and plant from immature zygotic embryos of the species *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*. *Plant Cell Reports* 7: 665-668
- Espinosa P.H., C. Arredondo, M.A. Cano, A.M. Canseco y F. Vázquez. 2002. La materia prima para producir el mezcal oaxaqueño. Catálogo de la diversidad de agaves. Folleto técnico No. 2, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias-SAGARPA, Oaxaca, 68 pp.
- Feirer R.P., Simon P.W. 1991. Biochemical differences between carrot inbreds differing in plant regeneration potential. *Plant Cell Reports* 10, 152-155.
- FERNÁNDEZ-GUIJARRO B., 1997. Embriogénesis somática en alcornoque (*Quercus suber* L.). Tesis Doctoral.E.T.S. Ingenieros de Montes. Universidad Politécnica de Madrid.
- FERNÁNDEZ-GUIJARRO B., CELESTINO C., TORIBIOM., 1994. Somatic embryogenesis in *Quercus suber* L. En: *Biotecnology of Trees* (Pardos J.A., Ahuja M.R., Elena Rossello R., eds). Investigación Agraria. Sistemas y Recursos Forestales. Fuera de Serie n.º 4. INIA. Madrid, España. pp. 105-110.
- Fiore, S, De Pasquale F, Carimi F, Carimi F y Sajeva M (2002) Effect of 2, 4-D and 4-CPMU on somatic embryogenesis from stigma and style transverse thin cell layers of citrus. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 68: 57-63
- Fuentes, S, Calheiros M, Manetti-Filho J, Vieira L (2000) The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 60: 5-13
- Fuji J., Slade D., Olsen R., Ruzin S., Redenbaugh K. 1990. Alfalfa somatic embryo maturation and conversion to plants. *Plant Sci.* 72, 93-97.
- George E., Hall, M., Geert-Jan De Klerk. (2008). *Plant Propagation by tissue culture* 3rd edition volume 1. Netherlands: Springer.
- Gómez, R, de Feria M, Posada LP, Gilliard T, Bernal M, Reyes V, Chávez M y Quiala M (2002) Somatic embryogenesis of the banana Irbid cultivar FHIA-18 (AAAB) in liquid medium scaled up in bioreactor. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 68: 21-26

- Gómez R.K. 1998. Embriogénesis somática. En: Pérez J.N. (Ed) Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, pp. 57-79.
- Haccius, B (1977) Question of unicellular origin of nonzygotic embryos in callus cultures. *Phytomorphology* 28: 74-81.
- Hartweek, L, Lazzeri P, Gui D, Collins G y Williams E (1988) Auxinorientation effects on somatic embryogenesis from immature soybean cotyledons. *In vitro Cell Dev. Biol.* 24: 821-829
- Hepher A., Boulter M.E., Harris N., Nelson R.S. 1988. Development of a Superficial Meristem During Somatic Embryogenesis from Immature Cotyledons of Soybean (*Glycine max L.*). *Annals of Botany* 62, 513-519.
- HERNÁNDEZ I., CELESTINO C., ALEGRE J., TORIBIO M., 2003. Vegetative propagation of *Quercus suber L.* by somatic embryogenesis: II. Plant regeneration from selected cork oak trees. *Plant Cell Rep* 21, 765-770.
- Ho W.J., Vasil I.K. 1983. Somatic embryogenesis in Sugarcane (*Saccharum officinarum L.*): Growth and Plant Regeneration from Embryogenic Cell Suspension Cultures. *Annals of Botany* 51, 719-726.
- Ivanova A., Velcheva M., Denchev P., Atanassov A., Van Onckelen H.A. 1994. Endogenous hormone levels during direct embryogenesis in *Medicago falcata*. *Physiologia Plantarum* 92, 85-89.
- Janick J. 1993. Agricultural uses of somatic embryos. *Acta Horticulturae*, 336: 207-215.
- Jansen M.A.K., Booij H., Schel J.H.N., De Vries S.C. 1990. Calcium increase the yield of somatic embryos in carrot embryogenic suspension cultures. *Plant Cell Reports* 9, 221-223.
- Jeannin G., Bronner R., Hahne G. 1995. Somatic embryogenesis and organogenesis induced on the zygotic embryo of sunflower (*Helianthus annuus L.*) cultivated *in vitro*: role of the sugar, *Plant Cell Reports* 15, 200-204.
- KLIMASZEWSKA K., CYR D.R., 2002. Conifer somatic embryogenesis: I. Development. *Dendrobiology* 48,31-39.
- Krishnaraj S., Vasil I.K. 1995. Somatic embryogenesis in Herbaceous Monocots En: Thorpe T.A. (ed). *In vitro* embryogenesis in plant. London: Kluwer Academic Publishers pp. 417-470.
- Lazzeri P.A., Hildebrand D.F., Collins G.B. 1987. Soybean somatic embryogenesis: effects of nutritional, physical and chemical factors. *Plant Molecular Biology Reporter* 10, 209-215.
- LELU M.A., BASTIEN C., DRUGEALT A., GOUEZM.L., KLIMASZEWSKA K., 1999. Somatic embryogenesis and plantlet development in *Pinus sylvestris* and *Pinus pinaster* on medium with or without growth regulators, *Physiol Plant* 105, 719-728.
- Liu C.M., Xu Z.H., Chua N.H. 1993. Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *The Plant Cell* 5, 621-630.
- MALABADI R.B., VAN STADEN J., 2005. Somatic embryogenesis from vegetative shoot apices of mature trees of *Pinus patula*. *Tree Physiol* 25, 11-16.

Martínez, M. y Pacheco, J. (2006). Protocolo para la micropropagación de *Furcraea macrophylla* Baker. *Agronomía Colombia* 24 (2):207-213.

Mejía, R. (1994). Propagación comercial 312 especies de plantas por cultivo in vitro. Peru.

MERKLE S.A., BATTLE P.J., 2000. Enhancement of embryogenic culture initiation from tissues of mature sweetgum trees. *Plant Cell Rep* 19, 268-273.

Merkle, S, Parrott W y Flinn B (1995) Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. En: Thorpe, TA (Ed) *In vitro* Embryogenesis in Plant. pp. 155-203. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Netherlands

Nomura, K y Komamine A (1995) Physiological and biochemical aspects of somatic embryogenesis. En: Torpe TA (Ed). *In vitro* Embryogenesis in Plants, pp. 249-265. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.

Merkle, S. A., Sotak, R. J., Wiecko, A. T. y Sommer, H. E. (1990). Optimization of the yellow-poplar embryogenic system. In: Proceedings of the 20th Southern Forest Tree Improvement Conference, pp. 183-186.

Mroginski, L., Sansberro, P., y Flaschland, L. (2010). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales.

Nayak P., Sen S.K. 1989. Plant Regeneration through somatic embryogenesis from suspension cultures of a minor millet, *Paspalum scrobiculatum*. *Plant Cell Reports* 8, 296-299.

Panis B. 1995. Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) germoplasm. Ph.D. Thesis, K.U. Leuven, Belgium p. 201.

PARK Y.S., POND S.E., BONGA J.M., 1994. Somatic embryogenesis in white spruce (*Picea glauca*): genetic control in somatic embryos exposed to storage, maturation treatments, germination and cryopreservation. *Theor Appl Gen* 89, 742-750.

PARK Y.S., POND S.E., BONGA J.M., 1993. Initiation of somatic embryogenesis in white spruce (*Picea glauca*): genetic control, culture treatment effects, and implications for tree breeding. *Theor Appl Gen* 86, 427-436.

Parrott, W (1993) Cell culture the Biotechnology applications for banana and plantain improvement. En: Proceeding of the workshop on Biotechnology applications for banana and plantain improvement, pp. 183-191. Reunión INBAP. 1992 San José, Costa Rica

Pérez. (1998). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de plantas. Cuba: principal.

Perrin, M, Martin D, Joly D, Demangeat G, This P, Masson JE (2001) Medium dependent response of grapevine somatic embryogenic cells. *Plant Sci*. 161: 107-116

Polito, V, McGranahan G, Pinney K y Leslie C (1989) Origin of somatic embryos from repetitively embryogenic cultures of walnut (*Juglans regia* L.). Implications for *Agrobacterium* mediated transformation. *Plant Cell Rep*. 8: 219-228

Puigderrajols, P, Mir G y Molinas M (2001) Ultraestructure of early secondary embryogenesis by multicellular and unicellular pathways in cork oak (*Quercus suber* L.). *Annals of Botany* 87 (2), 179-189

RAMAROSANDRATANA A., HARVENGT L., GARIN E., PÂQUES M., CALVAYRAC R., 1999. Factors influencing the development of mature somatic embryos of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). En: *Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics* (Espinel S., Ritter E., eds) Biofor' 99. Vitoria-Gasteiz, España. pp.271-274.

RANCILLAC M., KLINGUER A., KLINGUER S., MILLET B., 1996. Preliminary investigations on somatic embryogenesis from leaf discs of red oak (*Quercus rubra* L.) *Plant Growth Regul* 20, 67-73.

Razdan, M. (2003). *Introduction to plant tissue culture* (2da ed., pp.22-31). New Hampshire: Science Publishers.

Reinert, J (1958) Untersuchungen uber die morphogenese in gewebeulturen. *Ver. Dtsch. Bot. Ges.* 71: 15-24

Reynoso Santos, R., García Mendoza, J. A., López Báez, W., & Lopez Luna, A. (2011). Identificación taxonómica de las especies de agave utilizadas para la elaboración del licor Comiteco en Chiapas. 1-11.

Roca, W., y Mroginski, L. (Eds.) (1991) *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Cali Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

Rodríguez – Otubo, B, Pentiado M y do Valle C (2000) Embryo rescue of interespecific hybrids of *Brachiaria* spp. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 61: 175-182

RUAUD J.N., BERCETCHE J., PÂQUES M., 1992. First evidence of somatic embryogenesis from needles of 1-year-old *Picea abies*. *Plant Cell Rep* 11, 563-566.

Sannasgala, K (1989) *In vitro* somatic embryogenesis in *Musa*. PhD. Thesis. Leuven. Bélgica. Katholieke Universiteit Leuven

Sathyanarayana, B. & Varghese, D. (2007). *Plant tissue culture: Practices and new experimental protocols*. New Delhi: I. K. International.

Sato, S, Newel C, Kolacz K, Tredo L, Finer J y Hinchee M (1993) Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems. *Plant Cell Reports* 12: 408-413

Sharp, W. R., Sondahl, M. R., Caldas, L. S. y Maraffa, S. B. (1980). The physiology of in vitro asexual embryogenesis. *Horticultural Reviews*. 2:268-310.

Smith, M. K., y Drew, R.A. (1990). *Curent Applications of Tissue Culture in Plant Propagation and Improvement*. *Aust. J. Plan Physiol* 17:267-89.

Sondahl, M, Nakamura T y Sharp W (1991) Propagación *in vitro* del café. En: Roca, W. y Mooginski Li (eds). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. pp. 621-642. CIAT. Cali

Sung Z.R., Okimoto R. 1981. Embryonic proteins in somatic embryos of carrot. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 6, 3683-3687.

Schoofs H. 1997. The origin of embryogenic cells in *Musa*. Ph.D. Thesis, K.U. Leuven, Belgium p. 257.

SMITH D.R., 1999. Successful Rejuvenation of Radiata Pine. Proceedings 25th Biennial Southern Forest Tree Improvement Conference. New Orleans, Louisiana, USA. July 11-14, pp. 158-167.

Sterk P., Booij H., Schellekens G.A., van Kammen A., De Vries S.C. 1991. Cell-specific Expression of the Carrot EP2 Lipid Transfer Protein Gene. The Plant Cell 3, 907-921.

Steward, F, Mapes M y Mears K (1958) Growth and organized development of cultured cells. American Journal of Botany. 45: 705-708

Street, H y Withers L (1974) The anatomy of embryogenesis in culture. En Tissue Culture and Plant Science, pp. 179-187 Academic Press, London. New York.

Taiz, L. y Zeiger, E. (2006). Fisiología vegetal (vol. I). Castello de la Plana: Universitat Jaume-I.

Toonen M.A.J., Hendriks T., Schmidt E.D.L., Verhoeven H.A., Van Kammen A., De Vries S.C. 1994. Description of somatic-embryo-forming single cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking. Planta 194, 565-572.

TORIBIO M., FERNÁNDEZ C., CELESTINO C., MARTÍNEZ M.T., SAN-JOSÉ M.C., VIEITEZ A.M., 2004. Somatic embryogenesis in mature *Quercus robur* trees. Plant Cell Tissue Org Cult 76, 283-287.

TORIBIO M, CELESTINO C, GALLEGRO J, MARTÍNEZ I (2000) Induction of somatic embryogenesis in tissues from mature oak trees. En: Development of Integrated Systems for large-scale Propagation of elite Plants using In Vitro Techniques (Ó Ríordáin F., ed). Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg. EUR 19237. pp 236-237.

Trigiano, R. & Gray, D. (Eds). (2005). Plant development and biotechnology. New York: CRC Press.

Vasil V., Vasil K. 1982. Characterization of an embryogenic cell suspension culture derived from cultured inflorescences of *Pennisetum americanum* (pearl millet, *Gramineae*). American Journal of Botany 69, 1441-1449.

Von Arnold S, Bozhkov P, Clapham D, Dyachok J, Filonova L, Högeberg KA, Ingouff M, Wiweger M (2005) Propagation of Norway spruce via somatic embryogenesis. Plant Cell Tiss Org Cult 81:323-329.

Williams, E y Maheswaran M (1986) Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cell as an embryogenic group. Annals of Botany 57: 443-462

Xu, N. y Bewley, J. D. (1992). Contrasting pattern of Somatic and Zygotic embryo development in alfalfa (*Medicago Sativa L.*) as revealed by scanning electron microscopy. *Plant cell Reports*. 11:279-284.

Yadav, P. & Tyagi, R. (2006). *Biotechnology of plant tissue* (pp. 32-40). New Delhi: Arola Enterprises.

Yasuda, H., Nakajima, M., Masuda, H., y Ohwada. (2000). Direct formation of heart-shaped embryos from differentiated single carrot cells in cultura. *Plant Science*. 152: 1-6.

Zimmerman, J. L. (1993). Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants. *The Plant cell*. 5: 1411-1423.