



Instituto tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

Ingeniería Bioquímica

Reporte de residencia

“Análisis proteómico de callos de *Agave americana* L. tratados con
Metanosulfonato de Etilo”

Residente:

Ana Karen Morales Cordero

Asesor:

Dr. Federico Antonio Gutiérrez Miceli

Revisores:

Dr. Reiner Rincón Rosales

Dra. Patricia Guadalupe Sánchez Iturbe

Junio del 2014

INDICE

INTRODUCCIÓN	6
JUSTIFICACIÓN	8
OBJETIVOS	9
Objetivo general.....	9
Objetivos específicos	9
CARACTERISACIÓN DEL ÁREA EN QUE PARTICIPÓ.....	10
Misión.....	10
Visión.....	10
Localización.....	10
PROBLEMAS A RESOLVER	11
ALCANCES Y LIMITACIONES.....	12
Alcances.....	12
Limitaciones	12
FUNDAMENTO TEÓRICO.....	13
GENERALIDADES E HISTORIA.....	13
TÉCNICAS DE REGENERACIÓN	15
PROBLEMÁTICA <i>FUSARIUM</i>	15
MUTAGÉNESIS.....	16
Mutágenos y Mutagénesis.....	16
ANÁLISIS PROTEOMICO	16
TÉCNICAS PROTEÓMICAS.....	17
Electroforesis bidimensional (2D)	17
IEF.....	17
SDS-PAGE.....	18
Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida	19

Espectrometría de masas (MS)	19
MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry)	19
ESI-MS o MS/MS.....	20
Otros elementos tecnológicos asociados al estudio de proteómicos	20
ANÁLISIS MORFOLÓGICO	21
MATERIALES Y METODOS	22
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	22
MICROPROPAGACIÓN DE CALLOS DE <i>Agave americana</i> L. MEDIANTE ORGANOGÉNESIS.....	23
Cuadro No.1 Distribución de meristemas para proliferación de callos	23
Cuadro 2. Preparación del medio murashige and skoog (MS) con (2,4 – D) a 0.5mg/L para un total de 500ml de medio. (Tendekai et al, 2013)	24
EXPOSICIÓN DE CALLOS A METANOSULFANATO DE ETILO (EMS).....	24
Cuadro 3. Características de los tratamiento con EMS en callos de <i>Agave americana</i> L.	25
ESTUDIO MORFOLÓGICO (ANÁLISIS IN VITRO).....	26
Cuadro 4.- Análisis morfológico.....	26
EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS EN CALLOS DE <i>AGAVE AMERICANA</i> L.	26
CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS POR EL METODO DE BRANDFORD.....	27
ELABORACIÓN DE LA CURVA ESTANDAR	27
Cuadro 5. Concentraciones curva estándar de Brandford (1976)	28
Cuadro 6. Resultados de absorbancia para las muestras de callos	28
PREPARACION DE MUESTRA PARA REALIZAR ELECTROFORESIS.....	29
PREPARACION DEL GEL DE ELECTROFORESIS	30
Cuadro 7.- Concentraciones para preparar el gel de separación al 10%:.....	30
Cuadro 8.- Concentraciones para preparar gel de apilamiento al 4%:	31
Preparación de la cámara de electroforesis:	31
RESULTADOS	33

Resultados: aplicación de EMS a callos	33
Cuadro 9. - Observaciones a nivel macro y micro	33
Cuadro 10.- Pesos de los callos antes y después de aplicar EMS	36
Efecto de la exposición de callos a EMS en la regeneración de plántulas	37
Resultados: electroforesis SDS-PAGE.....	38
Cuadro 11.- Colocación de muestras en el gel de electroforesis	38
CONCLUSIONES	41
REFERENCIAS.....	42

ÍNDICE DE CUADROS		
No. De cuadro	Título	pagina
1	Distribución de meristemos para la proliferación de callos	21
2	Preparación del medio murashige and skoog (MS) con (2,4 – D) a 0.5mg/L para un total de 500ml de medio. (Tendekai et al, 2013)	22
3	Características de los tratamiento con EMS en callos de <i>Agave americana</i> L.	22
4	Análisis morfológico	24
5	Concentraciones curva estándar de Brandford (1976)	26
6	Resultados de absorbancia para las muestras de callos	26
7	Concentraciones para preparar el gel de separación al 10%	28
8	Concentraciones para preparar gel de apilamiento al 4%	29
9	Observaciones a nivel macro y micro de los callos tratados con EMS	31
10	Pesos de los callos antes y después de aplicar EMS	34
11	Colocación de muestras en el gel de electroforesis	35

ÍNDICE DE FIGURAS		
No. De figura	Título	Pagina
1	Agave Comiteco en la posada Montebello del centro de Comitán, Chiapas. Imagen tomada de la Revista número 10, especial del 1 de enero de 2010.	13
2	curva estándar de Brandford, linealizada y con valores de Y, R y X.	27
3	contenido del equipo de electroforesis SDS-PAGE	30
4	Ejemplificación de la colocación de las muestras sobre los pocillos	30
5	Imagen al comienzo de la corrida	35
6	primera corrida intercalada de chipilín y callos de agave	36
7	corrida con alumnos de licenciatura	36
8	segunda imagen corrida de chipilín a diferentes concentraciones	37
9	tabla referencia de pesos moleculares con la cámara bio-rad	37
10	Gel de la primera corrida bajo condiciones de: 100volts 15min, 80volts 60min.	40
11	Formas celulares previas a la formación de una nueva plántula (Zimmerman, 1992).	35

INTRODUCCIÓN

En los últimos años el tequila ha pasado de ser una bebida nacional, a ser un producto de reconocimiento internacional, con un importante crecimiento en los mercados de exportación y de consumo nacional (CESAVEG, 2007).

La especie *Agave americana* L. pertenece a la familia Agavaceae y es directamente responsable de la producción de aguamiel que se extrae en la región de Comitán de Domínguez estado de Chiapas, México; se fermenta utilizando para enriquecer los azúcares del mosto, algunas arrobas de panela de la región, que al destilar se obtiene la bebida “comiteco” siendo un detonante económico en la zona fronteriza del estado, no obstante algunos productores Chiapanecos no tienen suficientes plantas para el proceso. La micropropagación *in vitro* método que actualmente se estudia para la inducción de callos de diferentes explantes (entrenudo, hoja, raíz) y en la propagación de plántulas *in vitro* de plantas medicinalmente importantes (Kumer et al, 2014), llegó a ser una alternativa factible de implementarse para la obtención masiva de este maguey. Así mismo se sabe que mediante el cultivo *in vitro* se ha llevado a cabo la embriogénesis somática en *Eruca sativa* técnica que incurre de forma importante dotando de un número mayor de plantas para el desarrollo de la parte experimental o el análisis de sus diferentes componentes como lo son las proteínas (Chen et al, 2011).

Una vez obtenidas plantas de agave de forma *in vitro* los factores externos como la contaminación por hongos del género *Fusarium* interfieren enormemente en su adaptación al exterior debido a esta problemática de tipo fitosanitaria que actualmente se presenta en las zonas agaveras del estado de Chiapas se implementa la aplicación de metanosulfonato de etilo, mutágeno que ha logrado inducir la tolerancia al herbicida Imazapir en la caña de azúcar, la cual implicó inducción de la variación somaclonal a través de la exposición a 8 o 16 mM de metanosulfonato de etilo durante 4 h, donde finalmente se llevaron a cabo ensayos enzimáticos de las plantas que sobrevivieron y que demostraron un patrón de crecimiento normal (Aimée. et al, 2012). En la generación *in vitro* de variantes somaclonales en plantas de caña de azúcar para la tolerancia a *Fusarium sacchari*, hongo causal de la pudrición del tallo, las plantas de caña de azúcar tolerantes y resistentes a *F.*

sacchari PNG40 se produjeron exponiendo los callos embriogénicos al mutágeno químico etil metanosulfonato (EMS), (Mahlanza. et al, 2012) y de forma asonante encontraron que explantes de cultivos *in vitro*-crecidos de plátano (*Musa spp.*, Cv AAA Grupo. Highgate) Fueron tratados con varias concentraciones de mutágenos: ácido de sodio, sulfato de dietilo, y metanosulfonato de etilo para evaluar su eficacia en la inducción de mutaciones y también con el objetivo de producir variantes resistentes al hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. Obteniendo como resultado plantas con un 10% menos de síntomas externos provocados por la enfermedad (Bhagwat. et al, 1997).

Basados en las evidencias antes mencionadas se realizó la aplicación de EMS en callos de *Agave americana* L. para posteriormente analizar los posibles cambios en la estructura celular por medio del análisis morfológico en un Microscopio compuesto triocular con la técnica contraste de fases, asimismo comparamos las variaciones en el peso-masa de las muestras con la balanza analítica y finalmente se realizó electroforesis SDS-PAGE el cual ha sido utilizado en el caso de *Cyclamen persicum* Mill, una especie ornamental ampliamente cultivada que se propaga clonalmente por embriogénesis somática, para entender mejor la biología del desarrollo del embrión somático, donde aplicaron (electroforesis bidimensional en gel) detallada proteómica y análisis de espectrometría de masas (Bian. et al, 2009) llevaron a cabo un estudio para identificar las proteínas y péptidos específicos que podrían utilizarse como indicadores de la frescura y la calidad en el pescado donde la evolución *post mortem* de los patrones de proteínas en el músculo grande corvina amarilla se controló mediante SDS-PAGE y electroforesis bidimensional (2 DE), (Li. et al, 2013). Para aprovechar al máximo el recurso de proteínas, se requiere una amplia comprensión de la composición y características de las proteínas, estudios acerca de las proteínas de la nuez en el cual se han fraccionado y caracterizado analizando la composición de aminoácidos, fraccionamiento de proteína, la distribución del peso molecular y electroforesis en gel de proteínas de nogal (Mao et al, 2014) confirman la importancia de este análisis.

JUSTIFICACIÓN

El agave comiteco crece en Comitán, y la población de esta zona ha aprendido a aprovecharlo como un recurso natural para obtener el comiteco, bebida que además de significar una tradición por la cual es reconocido Comitán, es una fuente de recursos económicos para la población. En los últimos años sólo escasos ejemplares de este agave se han encontrado y no se cuenta con un lote de semillas que abastezca su actividad agrícola además la elaboración de la bebida es cada vez menos frecuente en la medida en que las poblaciones de agave se han perdido (Peña, 2008). Las pérdidas del agave comiteco han sido frecuentemente por la presencia del hongo fusarium, la persistencia del fusarium en el suelo durante uno a varios años se debe, principalmente, a la presencia de las clamidosporas. Estos requieren para germinar fuentes exógenas de nutrientes por lo que son muy sensibles al antagonismo, pero su distribución casi universal indica la omnipresencia de los microambientes específicos. La tolerancia de algunos fusarios, tales como *F. oxysporum* y *F. solani*, a una alta presión parcial de CO₂ permite el aislamiento selectivo de los mismos a partir de algunos substratos muy poblados (Griffin, 1973). Con la finalidad de crear una alternativa de solución se plantea un modelo experimental para la inducción de callos en *Agave americana* L. que permita formar cierta resistencia a la contaminación por hongos *fusarium* siendo tratados con Metanosulfonato de Etilo (EMS) reconocido mutágeno. La finalidad de este trabajo es obtener evidencias científicas que permitan observar los cambios en los callos de Agave que ya fueron tratados con EMS y de esta forma ampliar datos informativos sobre los efectos y resultados que producen este tipo de tratamientos.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar las variaciones en el perfil proteómico de callos de *Agave americana* L. como consecuencia del tratamiento con diferentes concentraciones de Metanosulfonato de Etilo (EMS).

Objetivos específicos

1. Implementar un protocolo para la propagación masiva de callos de *Agave americana* L.
2. Determinar los cambios en la morfología celular de los callos de *Agave americana* L. tratados con EMS.
3. Establecer la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil-sulfato de sódico (SDS-PAGE) para el análisis de proteínas en callos de *Agave americana* L. sometidos a mutagénesis.

CARACTERISACIÓN DEL ÁREA EN QUE PARTICIPÓ

Misión

Formar de manera integral profesionistas de excelencia en el campo de la ciencia y la tecnología y la tecnología con actitud emprendedora, respeto al medio ambiente y apego a los valores éticos.

Visión

Ser una institución de excelencia en la educación superior tecnológica del sureste, comprometida con el desarrollo socioeconómico sustentable de la región.

Localización

El proyecto se realizó en el laboratorio de Tejidos Vegetales y en el laboratorio de Biología Molecular localizados dentro del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, carretera panamericana Km.1080 s/n (Tuxtla Gutiérrez) CP. 29050. Coordenadas 16°46'N 93°05'O.

PROBLEMAS A RESOLVER

Para probar diferentes concentraciones del mutágeno es necesario contar con suficiente material biológico por lo que es necesario implementar un protocolo para la propagación masiva de callos de de *Agave americana* L.

Es necesario tener una herramienta visual para verificar si los callos han cambiado fenotípicamente para lo cual se dispone del estudio *in vivo* bajo la mira de un Microscopio compuesto con contraste de fases.

Debido a que no se tiene implementada la técnica para realizar el análisis de proteínas en callos de *Agave americana* L. tratados con EMS, el presente trabajo tuvo como objetivo establecer la técnica SDS-PAGE para el análisis de proteínas en callos de *Agave americana* L.

ALCANCES Y LIMITACIONES

Alcances

- La formación y resiembra de callos se llevo a cabo en los primeros tres meses obteniendo resultados positivos y se mantuvo de esta forma hasta el momento de su uso, durante 6 meses.
- La aplicación del mutágeno fue cumplida satisfactoriamente el día 24 de Abril
- El establecimiento de la técnica de extracción de proteínas se realizo durante los pasados 6 meses a pesar de las pruebas realizadas solo se han podido observar resultados positivos en otras plantas que fueron tomadas como estándar y a falta de tiempo se remite a continuar con la investigación para su posterior desarrollo.
- El reconocimiento del tejido vegetal y observación cualitativa se realiza en las últimas semanas como parte de la caracterización de los callos tratados con EMS y los controles positivos (callos sin aplicación de EMS).

Limitaciones

- La principal limitante fue el tiempo para realizar las pruebas dentro del laboratorio que permitieran confirmar la presencia de proteínas y qué tipo de peso molecular poseen ya que los callos de *Agave americana* L tuvieron muy poco contenido de proteína según los resultados obtenidos en la determinación de proteínas por el método de Bradford.

FUNDAMENTO TEÓRICO

GENERALIDADES E HISTORIA

La palabra agave significa “admirable”, regionalmente es llamado “Maguey” en honor de la diosa azteca Mayahuel. En voz náhuatl México significa “en el centro del maguey”. El agave o maguey es una planta que retiene agua y conserva suelo, con raíz generalmente superficial y que dependiendo del manejo agronómico y de las condiciones ambientales puede llegar a producir hijuelos o rizomas, en uno a tres años; en seis a ocho años algún otro producto (aguamiel, miel, pulque, mezcal, tequila, fibras, quiote o escapo, bulbillos ó bulbillos y semilla). Una plantación con deficiente manejo retrasará su producción por varios años.

Las partes principales del agave o maguey son: raíz, hijuelo o rizoma, cogollo o meristemo, piña o bola, penca u hoja, espina o puya y escapo o quiote. En la inflorescencia se producen las cápsulas con las semillas. Una planta puede llegar a producir unas 100,000 semillas (SESAVEG, 2007).

Fue en la primera mitad del siglo XX, cuando el “comiteco” registro su mayor auge no solo en Chiapas; pues en diversas ciudades de la republica mexicana, centro y Sudamérica, esta tradicional bebida de agave, tenía gran demanda; producción que termino ante la falta de apoyo gubernamental y la aparición de otras bebidas “similares”.

En años recientes se han llevado a cabo proyectos con la finalidad de conservar, en primera instancia, al maguey típico de la meseta comiteca, y para mejorar los procesos de producción del comiteco. Dentro de los proyectos enfocados en la preservación del agave comiteco se puede mencionar el caso de la reproducción del agave comiteco in vitro que se llevó a cabo en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) donde a partir de 200 semillas, de las cuales sólo germinaron 60, se lograron unas 25 000 plántulas in vitro. Este trabajo se publicó en 2008, y está completamente documentado en (El faro, 2008). Asimismo, complementando los esfuerzos de conservación del UNAM, en el Instituto

Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez (ITTG), Chiapas se están llevando a trabajos, en el posgrado de bioquímica, dentro del marco del proyecto “Innovación tecnológica para la reproducción, establecimiento, producción y aprovechamiento integral del agave comiteco” financiado por el Programa de Estímulo a la Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación del fondo para la innovación tecnológica de la Secretaría de Economía-CONACyT. Además, es importante mencionar las gestiones que el ITTG está llevando a cabo para lograr una denominación de origen de esta bebida (Díaz, 2013).



Figura 1.- Agave Comiteco en la posada Montebello del centro de Comitán, Chiapas. Imagen tomada de la Revista número 10, especial del 1 de enero de 2010.

En el caso del agave comiteco, el desconocimiento de su ciclo de vida, aunado a la falta de un manejo adecuado del cultivo, así como de procedimientos efectivos de producción sustentable, quizá sean las causas de que esté prácticamente desaparecido en la región, lo que podría acarrear la extinción de toda una tradición, que es una manifestación cultural de la zona. Por otra parte, se cuenta con poca o nula información sobre esta especie. Se le asocia con *Agave americana* y *Agave sisalana*, por lo que es necesario realizar un estudio para establecer su identidad taxonómica y sus usos, considera el investigador, además de aplicar un método eficiente de su propagación in vitro y difundir sus beneficios en las comunidades de la región, como medidas para lograr su conservación (Peña, 2008).

TÉCNICAS DE REGENERACIÓN

El cultivo de tejidos es una rama de la biología que permite dividir a cualquier organismo vegetal en sus bloques constituyentes, sean células individuales, tejidos, órganos o la planta completa. Se toma un trozo de raíz, tallo, hojas o pétalos, que se siembran asépticamente bajo condiciones controladas, haciendo que lo era una hoja se convierta en un organismo completo. Además, el proceso puede implicar la producción de grandes cantidades de plantas en tiempos menores a los procedimientos convencionales. Se estima que en el mundo se producen in vitro más de 500 millones de todo tipo de plantas, que posteriormente son manejadas de manera convencional con transplante a suelo, tras una fase de aclimatación.

Todas las células de un organismo, inclusive en nosotros los humanos, tienen en el núcleo la información genética que dicta cómo vamos a ser. Si cada célula del agave tiene esta información, bajo condiciones que deben explorarse experimentalmente, es posible lograr inducir que cada célula se convierta en un nuevo organismo, detalló el investigador doctor Víctor Manuel Chávez Ávila (Peña, 2008).

PROBLEMÁTICA *Fusarium*

Fusarium oxysporum f. es el agente que causa la enfermedad conocida como amarillamiento por *Fusarium* o marchitamiento por *Fusarium*. Invade y deteriora el sistema vascular de la planta, que por ello se marchita y, finalmente, muere.

El hongo penetra en la planta por las raíces, invade luego algunos vasos del xilema y pronto taponan todo el sistema vascular. El primer síntoma es un amarillamiento, más adelante se observa la marchitez de las hojas por falta de nutrientes y, por último, la defoliación de la planta (Seifert, 2001).

Las colonias de los distintos fusarios que crecen moderada a profusamente, tienen diversos colores (blanco, rosado pálido, rojo, anaranjado, púrpura, celeste, verde aceituna o pardo), especialmente en el reverso de la colonia, excepto pardo obscuro o negro. El micelio es ralo o denso, ya sea algodonoso, como un fieltro o con una zona central de funículos, pero en algunos casos es limoso. Hay fusarios con pionotos de color anaranjado. Los pigmentos que difunden en el agar suelen variar de color o tono con el pH. Algunas especies presentan

zonas concéntricas de distinta morfología macroscópica debido a la secuencia luz - oscuridad (Seifert, 2001).

MUTAGÉNESIS

La mutagénesis es el proceso por el que se genera una mutación, esta se define como un cambio hereditario en el material genético. Existe gran evidencia de que una amplia variedad de agentes ambientales incluyendo los carcinógenos interactúan directamente con el ADN, produciendo cambios hereditarios, por lo que los estudios de mutagénesis son importantes para la evaluación de los riesgos de mutagenicidad y carcinogenicidad de los agentes químicos y físicos (De la Rosa et al, 1997).

Mutágenos y Mutagénesis

Los mutágenos son agentes físicos o químicos capaces de inducir en los seres vivos varias clases de cambios deletéreos heredables. El ADN celular está organizado en genes y estos, a su vez, en cromosomas, los cuales, en los organismos superiores, se alojan en el núcleo celular. La información genética es muy estable, sin embargo, las mutaciones ocurren espontáneamente, con frecuencias muy bajas en las células que aparentemente no están expuestas a agentes mutagénicos externos. La exposición a mutágenos incrementa las frecuencias de mutación por arriba de las frecuencias de “de fondo” por lo general, la frecuencia de mutación está en proporción directa a la dosis del mutágeno aplicado, aunque en la relación dosis-respuesta pueden presentarse patrones más complejos (De la Rosa et al, 1997).

ANÁLISIS PROTEOMICO

Proteoma hace referencia al conjunto completo de proteínas que se expresan a partir del genoma de una célula o tejido en un determinado momento. La proteómica es el estudio y caracterización de todo el conjunto de proteínas expresadas de un genoma (proteoma). Las técnicas de proteómica abordan el estudio de este conjunto de proteínas. La Proteómica permite identificar, categorizar y clasificar las proteínas con respecto a su función y a las interacciones que establecen entre ellas. De este modo, se pueden caracterizar las redes funcionales que establecen las proteínas y su dinámica durante procesos fisiológicos y patológicos.

La proteómica se está aplicando en la identificación de nuevos marcadores para el diagnóstico de enfermedades, la identificación de nuevos fármacos, la determinación de proteínas involucradas en la patogénesis de enfermedades y el análisis de procesos de transducción de señales. El proteoma de una célula varía según el estado en el que se encuentre la célula, si se encuentra en una situación de estrés, bajo el efecto de fármacos o de una hormona. Así, en cada momento y en cada tipo celular el perfil de proteínas expresadas será diferente. La proteómica es útil para estudiar estas diferencias. Existen tres ramas en la proteómica que tratan de caracterizar el proteoma estudiando distintos aspectos del mismo (FIBAO, 2007).

TÉCNICAS PROTEÓMICAS

La estrategia metodológica básica para los estudios de proteómica consiste en emplear una técnica que permita separar e identificar a todas las proteínas contenidas en un proteoma. La técnica de separación de proteínas más usada en proteómica es la electroforesis bidimensional (2D, BD). Para la identificación de proteínas se emplea la espectrometría de masas (MS), (FIBAO, 2007).

Electroforesis bidimensional (2D)

La electroforesis bidimensional combina dos procedimientos de separación diferentes: el isoelectroenfoque (IEF) y la electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), (FIBAO, 2007).

IEF

Las proteínas son separadas en base a su carga eléctrica intrínseca. En un IEF, las proteínas se desplazan bajo un campo eléctrico a través de un gel de poliacrilamida, en el que se ha creado con un gradiente de pH por medio de unas moléculas denominadas anfóteras. Las proteínas migran a través del gel hasta alcanzar la zona de pH de igual valor a sus puntos isoeléctricos (pI), donde adquieren carga neta neutra y dejan de ser atraídas por los polos eléctricos del sistema electroforético. Así, las proteínas se separan en función de su pH, (FIBAO, 2007).

SDS-PAGE

Dodecil-sulfato de sodio electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) es una técnica para la separación de proteínas en función de su capacidad de moverse dentro de una corriente eléctrica, que es una función de la longitud de sus cadenas de polipéptidos o de su peso molecular. Esto se logra mediante la adición de detergente SDS para eliminar estructuras de proteínas secundarias y terciarias y para mantener las proteínas como cadenas polipeptídicas. Las capas de SDS las proteínas, sobre todo proporcionales a su peso molecular, y confiere la misma carga eléctrica negativa a través de todas las proteínas en la muestra. Las proteínas glicosiladas pueden no migrar en su peso molecular esperado ya que su migración se basa más en la masa de sus cadenas de polipéptidos, no los azúcares que se adjuntan (Sambrook et al, 1989).

Es el segundo paso en el proceso de la electroforesis 2D. El gel IEF desarrollado anteriormente se coloca sobre un gel de poliacrilamida con SDS (dodecil-sulfato de sodio). Al aplicar un campo eléctrico, las proteínas migrarán hacia el polo positivo introduciéndose en el gel SDS-PAGE. El SDS determina que todas las cadenas peptídicas tengan igual relación carga/masa, por lo que éstas se diferencian entre sí por su peso molecular. La porosidad del gel determina que las proteínas se separen en función de su tamaño. Las más pequeñas migrarán a mayor velocidad que las grandes y el recorrido a través del gel será mayor (Sambrook et al, 1989), (Thermofisher científico, 2014).

El sistema de gel más ampliamente utilizado para la separación de una amplia gama de proteínas por SDS-PAGE es el sistema de Laemmli (1970), que utiliza geles de Tris-glicina que comprenden un componente de gel de apilamiento (que se utiliza para ayudar a enfocar las proteínas en bandas nítidas a partir de la corrida electroforética) y el gel de resolución, donde se utilizan porcentajes variables de gel de acrilamida para separar las proteínas en función de su peso de la masa. Este sistema clásico usa un sistema tampón discontinuo en el que el pH y la fuerza iónica del tampón utilizado para ejecutar el gel (Tris pH 8,3) es diferente de los tampones usados en el gel de apilamiento (Tris, pH 6,8) y gel de resolución (Tris, pH 8,8).

El pH de operación altamente alcalina del sistema de Laemmli puede causar distorsión de la banda, la pérdida de resolución, o bandas de artefactos. Finalmente las principales causas de la mala resolución banda con el sistema de Laemmli son:

- La hidrólisis de poliacrilamida al pH de lavado de gel, lo que resulta en una vida útil corta de 4-6 semanas.
- Las modificaciones químicas tales como desaminación y de alquilación de las proteínas debido al alto pH de la separación de gel.
- La reoxidación de disulfuros reducidos de cisteína que contienen en proteínas como el estado redox del gel no es constante.
- La escisión de Asp-Pro enlace de las proteínas cuando se calienta a 100 ° C en el tampón de muestra de Laemmli, pH 5,2 (Thermo Fisher científico, 2014).

Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida

Para detectar las proteínas en un gel de poliacrilamida existen varios métodos, por ejemplo: tinción con colorantes orgánicos (p.e. azul Coomassie), tinción con plata, o tinción con compuestos fluorescentes.

Espectrometría de masas (MS)

La espectrometría de masas (MS) permite identificar a cada proteína separada por electroforesis 2D u otros métodos (Moral 2008).

MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry)

La proteína objeto de análisis es fragmentada en péptidos con proteasas específicas (generalmente, la tripsina) antes de ser aplicada al espectrómetro de masas. Los péptidos son incluidos en una matriz acrílica. Un pulso láser impacta sobre la matriz, volatilizando e ionizando los péptidos que contiene. Los péptidos se introducen en el MS, se aceleran a través de un campo electromagnético y vuelan hasta llegar a un detector. Según la relación masa-carga (m/z) del péptido tardará más o menos tiempo en llegar al detector. Como resultado, el detector registrará un espectrograma denominado mapa peptídico, exclusivo y

característico de la proteína analizada. El mapa peptídico se somete a análisis comparativo con miles de mapas peptídicos teóricos almacenados en las bases de datos on line. Si coincide con algún mapa teórico, la identificación es positiva (Moral 2008).

ESI-MS o MS/MS

En el caso de no obtener la identificación de la proteína por medio de MALDITOF, se puede recurrir al ESI-MS (electro-spray ionisation mass spectrometry) que permite secuenciar los aminoácidos de un péptido. En este caso, los péptidos procedentes de la digestión con tripsina suelen ser separados previamente por microcromatografía de alta resolución. Se selecciona un pico cromatográfico (el pico cromatográfico no tiene por qué corresponder a un solo tríptico, puede estar compuesto por un conjunto de trípticos) y se dirige hacia el MS. La salida del sistema cromatográfico se realiza a través de un spray altamente electrificado, que permite ionizar a los trípticos. Estos entran al sistema de detección de iones, generalmente, compuesto por dos espectrómetros de masas en tandem, por lo que a este sistema también se le denomina masas-masas (MS-MS). El primer MS resuelve cuantos trípticos diferentes hay en la muestra que se ha introducido. Se selecciona un determinado tríptico al que se le permite el paso a una cámara, donde la colisión con moléculas de un gas inerte (por ejemplo, argón) va a producir una subfragmentación aleatoria del péptido original (CID, collision-induced dissociation). Se genera así una colección de fragmentos consistente en aminoácidos libres, dipeptidos, tripeptidos, tetrapéptidos, etc. Los fragmentos entran en el segundo MS, donde son separados por campos electromagnéticos hasta llegar al detector. La interpretación global de los subpéptidos detectados permite resolver la secuencia del péptido original analizado. Por tanto, este método permite identificar proteínas no representadas en las bases de datos genómicas, así como permite detectar modificaciones post-traduccionales (Moral 2008).

Otros elementos tecnológicos asociados al estudio de proteómicos

Para analizar y comparar los resultados entre proteómicos, generalmente se utiliza un escáner para digitalizar la imagen del gel y sistema de análisis computarizado. Para tomar una muestra del gel con precisión, se recurre a un sistema robotizado que “pica” una

porción de gel en las coordenadas que se le indican por ordenador. Otros elementos pueden ser un sistema formador de matrices con los fragmentos peptídicos, o sistemas de micropurificación que separan e identifican los péptidos trópticos y los dirige hacia el ESI-MS.

La captura por microdissección laser (LCM) permite seleccionar, recortar y extraer a partir de tejidos aquellas células de interés y poder hacer estudios proteómicos precisos (Moral 2008).

ANALISIS MORFOLÓGICO

Sin embargo para la caracterización mas específica de los tejidos vegetales no basta con el análisis proteómico también existen métodos para el análisis morfológico. Gracias a los avances y el progreso en el campo de la microscopia, el hombre ha sido capaz de ver organismos y estructuras que a simple vista serian invisibles y, con ello, efectuar descubrimientos decisivos en el campo de la microbiología, relacionados con las transformaciones de la materia orgánica, las causas de las enfermedades o los agentes implicados en los cambios geoquímicos.

Contraste de fases es una técnica que se utiliza para estudiar aquellas preparaciones de densidad homogénea y transparentes, como son las bacterias, células, etc., en las que la baja capacidad de absorción hace que la imagen obtenida no presente diferencia de luminosidad entre sus elementos, permaneciendo prácticamente invisibles los detalles. Para aumentar el contraste de la imagen se requiere de la preparación de un colorante adecuado, aunque esto no siempre es útil ya que dificulta la observación “in vivo” del elemento estudiado (Arraiza et al, 2014).

La coloración en vivo se puede hacer de dos maneras:

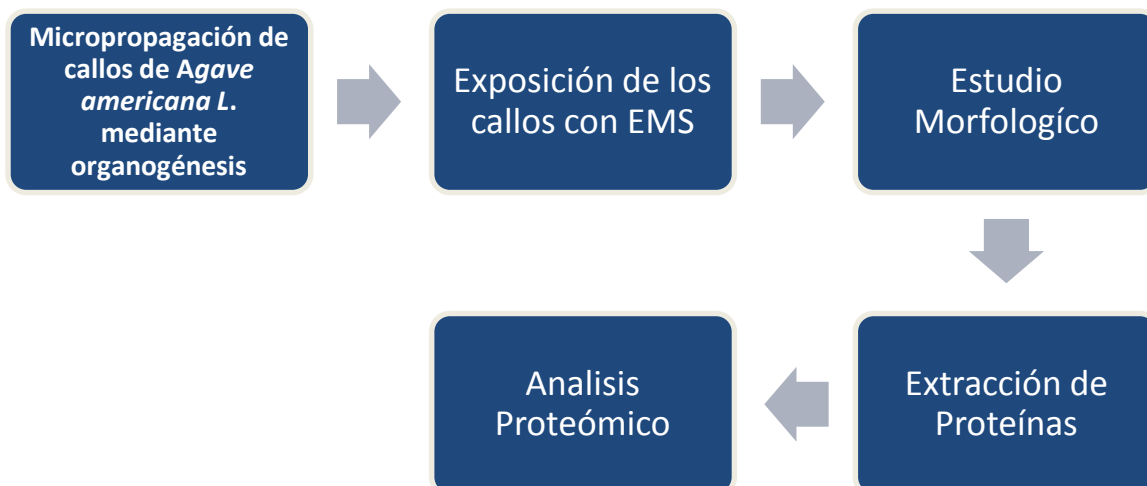
- 1.- por difusión: en el espacio entre portaobjetos y cubreobjetos de una preparación en fresco, se pone una gota de colorante que penetra en la muestra por capilaridad.
- 2.- mezclando una gota de colorante con el material que ha de ser examinado en el portaobjetos y colocando luego el cubreobjetos.

Tanto en un examen en fresco como en una coloración vital pueden realizarse procedimientos de microcompresión, disociación, e incluso fragmentación.

MATERIALES Y METODOS

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

De acuerdo a la obtención de callos por el método de organogénesis indirecta en cultivo in vitro realizado en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, se obtuvieron 30 muestras de callos para las cuales se implemento un diseño experimental con la finalidad de evaluar las variaciones en características morfológicas y en el perfil proteómico de callos de *Agave americana L.* como consecuencia del tratamiento con diferentes concentraciones y tiempos de residencia en Metanosulfonato de Etilo, donde se integro de esta forma las siguientes etapas:



MICROPROPAGACIÓN DE CALLOS DE *Agave americana* L. MEDIANTE ORGANOGÉNESIS

Se prepararon 1500 mL de medio murashige and skoog (MS) suplementado con ácido 2, 4 diclofenoxiacético (2,4-D) para colocar 25mL por cada frasco siendo un total de 46 frascos. Se tomaron explantes de *agave americana* L. desarrolladas en técnica *in vitro* con un tiempo de vida de 6 meses dentro del laboratorio. Los explantes pertenecientes a meristemos, raíces y hojas fueron significativamente importantes para la proliferación de callos (Reyes-Sambrano, 2011) ya que previamente fueron seleccionados como resultados positivos experimentales. Con la finalidad de crear y acaparar las diferentes posibilidades de obtener la cantidad necesaria de callos se realizaron diferentes tipos de explantes como se indica a continuación.

Para la generación de callos se tomaron de forma aséptica explantes de dos centímetros de largo en una planta de agave previamente criada en condiciones *in vitro*, este explante fue dañado por raspones superficiales, abaxial o adaxial según sea el caso después se colocaron en medio MS a incubación.

Cuadro No.1 Distribución de meristemos para proliferación de callos

No. De frascos	Características del frasco
3	Fascos con 2 meristemos por frasco
2	Fascos con brotes de callos que son trasplantados, uno con 3 y otro con 2 brotes
3	Fascos con 2 hojas a las que se realiza daño horizontal 4 cortes
3	Fascos con plántulas pequeñas hojas y raíces las cuales son trasplantadas
3	Fascos con 2 hojas, daño horizontal, 3 cortes

3	Frascos con 2 hojas daño vertical: 1 corte, 2 cortes y el ultimo 0 cortes
3	Frascos con 2 hojas sin daños
8	Frascos con daño
10	Frascos sin daño
3	Frascos con 2 muestras de la base de la planta (tallo) con daño
3	Frascos con 2 muestras de la base sin daño
2	Frascos con 1 tronco (raíz principal y tallo)

Cuadro 2. Preparación del medio Murashige and Skoog (MS) con (2,4 - D) a 0.5mg/L para un total de 500ml de medio. (Tendekai et al, 2013)

Sustancia	Cantidad
MS	2.15g
Sacarosa	15g
Mianositol	50mg
Fostato	25mg
Vitaminas	5mL
Phytigel	1.25g
2,4 - D	500µL

EXPOSICIÓN DE CALLOS A METANOSULFANATO DE ETILO (EMS)

El tratamiento consistió en la exposición de los callos a EMS empleando un tiempo de residencia de dos y cuatro horas como mejores tiempos para la observación de resultados significativos basados en (Tenekai et al, 2013).

Después de haber sometido los callos a EMS se realizo el pesado de los callos antes y después del tratamiento, con un tiempo de un mes y medio en cámara bioclimática, para observar las variaciones.

Cuadro 3. Características de los tratamiento con EMS en callos de *Agave americana* L.

No. De tratamiento	Peso del callo en gr.	Tiempo de residencia con el mutágeno	Características del tratamiento
2 ¹	0.519	0hr	Muestras de callo sin aplicación de mutágeno
2 ²	0.585	0hr	
2 ³	0.624	0hr	
3 ¹	0.477	2hr	El mutágeno se encontraba a una concentración de 15mM
3 ²	0.367	2hr	
3 ³	0.269	2hr	
4 ¹	0.312	4hr	El mutágeno se encontraba a una concentración de 15mM
4 ²	0.244	4hr	
4 ³	0.362	4hr	
5 ¹	0.346	2hr	El mutágeno se encontraba a una concentración de 30mM
5 ²	0.349	2hr	
5 ³	0.351	2hr	
6 ¹	0.183	4hr	El mutágeno se encontraba a una concentración de 30mM
6 ²	0.249	4hr	
6 ³	0.289	4hr	
7 ¹	0.430	2hr	El mutágeno se encontraba a una concentración de 45mM
7 ²	0.467	2hr	
7 ³	0.424	2hr	
8 ¹	0.365	4hr	El mutágeno se encontraba a una concentración de 45mM
8 ²	0.168	4hr	
8 ³	0.321	4hr	
9 ¹	0.257	2hr	El mutágeno se encontraba a una concentración de 60mM
9 ²	0.396	2hr	
9 ³	0.272	2hr	
10 ¹	0.226	4hr	El mutágeno se encontraba a una concentración de 60mM
10 ²	0.247	4hr	
10 ³	0.293	4hr	

ESTUDIO MORFOLOGÍCO (ANÁLISIS IN VITRO)

El análisis *in vitro* consistió en la observación de células y tejidos muertos. Para ello se realizaron una serie de pasos, como lo fueron la fijación, la inclusión, el corte (microtoma), la tinción y el montaje (Arraiza et al, 2014). Para realizar este análisis se tomó una muestra con un peso aproximado de 0.1gr por tratamiento y se realizó un corte transversal con un espesor aproximado a 1mm para luego llevar a cabo la tinción con azul de metileno durante 35seg, inmediatamente después se retiró el exceso de color con ayuda de un kleenex, se colocó el cubreobjetos y se observó al microscopio a 40X.

Cuadro 4.- Análisis morfológico

No. tratamiento	Corte	Observaciones
2 ¹ (muestra 1 de 3)	Transversal	Tinción con azul de metileno y observación a 40X
3 ¹	Transversal	Tinción con azul de metileno y observación a 40X
4 ¹	Transversal	Tinción con azul de metileno y observación a 40X
5 ¹	Transversal	Tinción con azul de metileno y observación a 40X
6 ¹	Transversal	Tinción con azul de metileno y observación a 40X
7 ¹	Transversal	Tinción con azul de metileno y observación a 40X
8 ¹	Transversal	Tinción con azul de metileno y observación a 40X
9 ¹	Transversal	Tinción con azul de metileno y observación a 40X
10 ¹	Transversal	Tinción con azul de metileno y observación a 40X

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS EN CALLOS DE *Agave Americana L.*

Los callos fueron obtenidos del sistema de micropropagación *in vitro* de edad aproximada de 4 meses en cámara bioclimática, sembrando con un periodo de 1 mes. Posteriormente se pesó 1gr de muestra de callos (muestra A). La muestra A, previamente pulverizada con ayuda de nitrógeno líquido, se colocó en un tubo eppendorf donde se adicionó 1ml de solución tampón de extracción [0.1 M de Tris-HCl (pH 8); 0.1% (w/v) de ácido ascórbico; 10% (v/v) de glicerina; 1% (w/v) de polivinilpirrolidona y 5% (w/v) de

B-mercaptoetanol], se agito para su posterior incubación a una temperatura de 4°C durante 4 hrs.

Las muestras fueron centrifugadas a 15000 rpm durante 1min, el sobrenadante se utilizo para realizar la curva estándar y para la electroforesis. Las muestras se manejaron en diferentes concentraciones de 1g, 0.5g, 0.2g y 0.1g para comparar el contenido de proteínas que fueran representativas en el análisis de electroforesis así como en el Brandford; los resultados demostraron que era necesario 1g de muestra de callos para observar las bandas en el gel de corrida.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS POR EL METODO DE BRANDFORD

El método que se utilizo durante estas prácticas se baso en el siguiente principio: se emplea un colorante hidrofóbico cuyas disoluciones acuosas en presencia de ac. Fosfórico tienen un color pardo y que al encontrarse en el entorno hidrofóbico del interior de una proteína, origina un color azul intenso que se puede medir fácilmente. Este método depende pues de la interacción relativamente inespecífica entre un colorante hidrofóbico y las proteínas, por lo que es relativamente sensible a la presencia de contaminantes tales como restos de detergente y líquidos orgánicos como el metanol. Su principal ventaja es que resulta más rápido y fácil de emplear que otros métodos alternativos, y más sensible que la medida de absorbancia a 280 nm. (Brandford 1976).

Para la preparación del reactivo de Brandford se disolvió 100mg de azul de coomassie en 50ml de alcohol al 95%, se añadió 100ml de ácido fosfórico al 85% y se aforo hasta 1L con agua destilada, una vez mezclado se filtro con papel whatman #1.

ELABORACIÓN DE LA CURVA ESTANDAR

Se preparo una solución patrón de proteína con albumina de suero bovino (BSA) a una concentración de 2mg/ml (sol. Stock). Para la solución de BSA se disolvieron 20mg de BSA en 10ml de agua estéril.

Se tomaron las siguientes concentraciones de la solución estándar para realizar la curva estándar:

Cuadro 5. Concentraciones curva estándar de Brandford (1976)

Concentración (mg/ml)	Volumen sol. Stock (µL)	Vol. De agua (µL)	Vol. Total (µL)	Absorbancia
0	0	2000	2000	Blanco
5	100	1900	2000	0.451
10	200	1800	2000	0.453
15	300	1700	2000	0.467
30	600	1400	2000	0.499
60	1200	800	2000	0.527
80	1600	400	2000	0.530
100	2000	0	2000	0.590

Cuadro 6. Resultados de absorbancia para las muestras de callos

Muestra (g)	Absorbancia (nm)	% de proteína
Callos 0.1	0.546	0.76
Callos 0.2	0.504	0.44
Callos 0.5	0.507	0.46
Callos 1	0.707	2.00
Moringa 0.1	0.600	1.18
Moringa 0.2	0.679	1.79
Moringa 0.5	0.874	3.29
Moringa 1	1.310	6.64

Con los resultados obtenidos anteriormente se realizó la siguiente curva, despejando a “X” de la ecuación obtenida, con los resultados de la curva obtuvimos que:

$$X = (Y - 0.446) / 0.0013$$

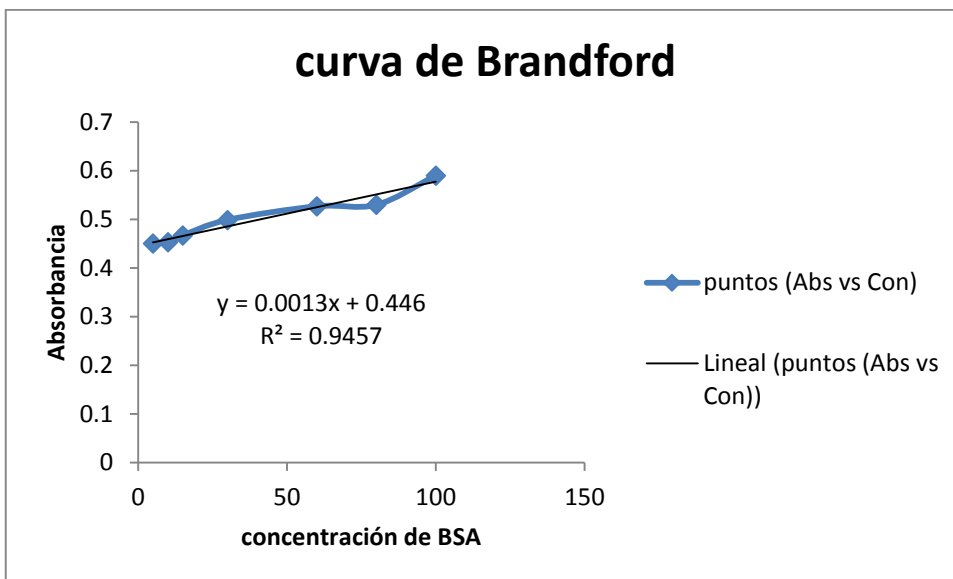


Figura 2.- curva estándar de Bradford, linealizada y con valores de Y, R y X.

PREPARACION DE MUESTRA PARA REALIZAR ELECTROFORESIS

De las muestras A, previamente centrifugadas a 15000 rpm durante 1min, se tomaron 10µl del sobrenadante que se colocaron en un tubo eppendorf mas 10µl de laemmlí y se agitaron vigorosamente (muestra B). La muestra B fue llevada a un baño maría a 90°C durante 5min, de la muestra B se tomaron 15µl y se colocaron dentro de uno de los pocillos para corrida del gel de electroforesis como se indica en la imagen numero 2.

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS METODO SECUNDARIO DE PRUEBA

Se tomaron 0.5g de callos (muestra 1), se trituraron con la ayuda de nitrógeno líquido dentro de un mortero, la muestra se colocó dentro de un tubo eppendorf de 1.5mL para adicionar 0.5mL de solución buffer de extracción de proteínas con la cual permaneció 4hr en incubación a 4°C.

De la muestra 1 se tomaron 400µL de sobrenadante, se colocaron en un nuevo tubo y se adicionaron 100µL de solución acuosa de ácido tricloroacético (TCA) al 40% frío (muestra 2), se incubó 40min a 4°C una vez terminado el tiempo de residencia se centrifugó a 15000 rpm a 4°C por 15min, el sobrenadante se decantó y se guardó para su posterior corrida dentro del gel esto con la finalidad de observar si existían proteínas suspendidas, a la

pastilla formada de la muestra 2 se le adicionaron 100µL de TCA al 10% frio a 4°C, después de 40min de incubación se centrifugo a 15000 rpm durante 15min a 4°C.

La pastilla formada se enjuago con 25 µL de agua destilada. Se re suspendió la pastilla con 400µL de acetona frio y se incubo a 0°C durante 1 hora (muestra 3). La muestra 3 se centrifugo bajo las mismas condiciones que las anteriores y se decanto. Se adiciono 20µL de laemmli 1X a la pastilla formada por el precipitado y se incubo durante 5min a 90°C (muestra 4).

Finalmente se tomaron 15µL de la muestra 4 para correr dentro de los pocillos del gel de electroforesis.

PREPARACION DEL GEL DE ELECTROFORESIS

La electroforesis es una técnica para la separación de moléculas según la movilidad de estas en un campo eléctrico. La separación puede realizarse sobre la superficie hidratada de un soporte sólido (p. ej., electroforesis en papel o en acetato de celulosa), o bien a través de una matriz porosa (electroforesis en gel), o bien en disolución (electroforesis libre). Dependiendo de la técnica que se use, la separación obedece en distinta medida a la carga eléctrica de las moléculas y a su masa (Laemmli 1970).

En este caso el gel de electroforesis se hizo de 1mm de espesor (gel de SDS-poliacrilamida con 10% de gel de separación y 4% de gel de apilamiento). Es importante mencionar que durante la preparación de cada uno de los geles debe de colocarse cada reactivo en orden siendo al final adicionada la solución de Temed debido a que es un reactivo de polimerización (Thermo scientific, producto No. 17919).

Cuadro 7.- Concentraciones para preparar el gel de separación al 10%:

SOLUCION	REQUERIDO DE LA SOLUCIÓN (ml)
Acrilamida-basic 30:08	3.3
Tris- HCl 1.5m pH 8.8	2.5
SDS 10%	100µL

Persulfato de amonio 1%	500 μ L
Agua destilada	4.53
Temed	10 μ L

Cuadro 8.- Concentraciones para preparar gel de apilamiento al 4%:

SOLUCION	REQUERIDO DE LA SOLUCIÓN (ml)
Acrilamida-basico 30:08	1.3
Tris- HCl 0.5m pH 6.8	2.5
SDS 10%	100 μ L
Per sulfato de amonio 1%	500 μ L
Agua destilada	5.64
Temed	10 μ L

Preparación de la cámara de electroforesis:

- Primero se limpiaron los vidrios, cuidadosamente con agua y jabón, después se limpiaron con alcohol finalmente se enjuagaron con agua destilada y secaron.
- Ya armado el dispositivo que servirá como molde para el gel, fue llenado con agua destilada para comprobar que no existiesen fugas, después se retiro el agua y seco.
- Utilizando el peine como guía se marco el nivel al cual debe llegar el gel de separación, fue llenado y dejado para polimerizar aproximadamente durante 30 min una vez seco se procedió a inyectar el gel de apilamiento que va después del gel de separación y se coloco el peine que dio forma a los pocillos.

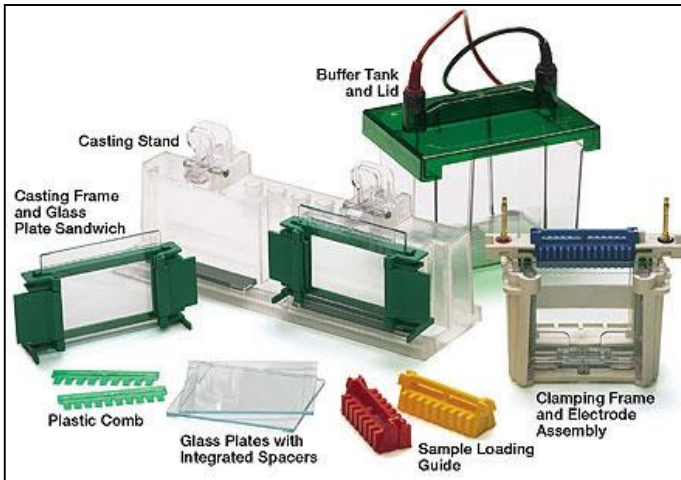


Figura 3.- contenido del equipo de electroforesis SDS-PAGE

- Después de que el gel polimerizo se separo el peine y las posas quedaron hechas para cargar las muestras. Posteriormente se coloco la cámara en el soporte y se inserto en la caja de electroforesis, una vez colocada de esta forma se lleno la cámara con la solución amortiguadora de corrida hasta cubrir completamente los pocillos.
- Se cargaron las posas con 15 μ L de muestra así como también se coloco el marcador de tamaño y el BSA en las mismas cantidades para tener una referencia estándar.
- Las muestras se corrieron a un voltaje de 100 volts durante 10min para después correrlas a 90 volts por 1 hora.

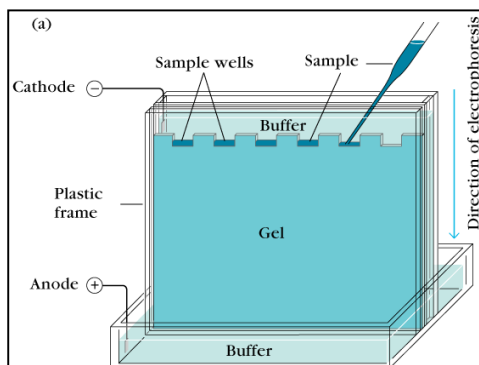

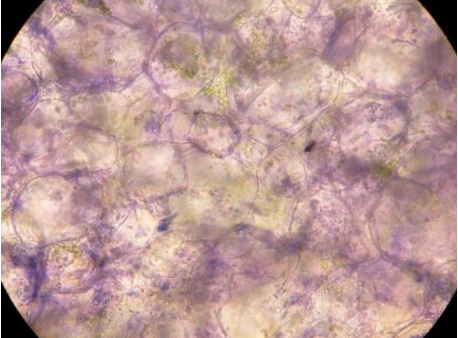

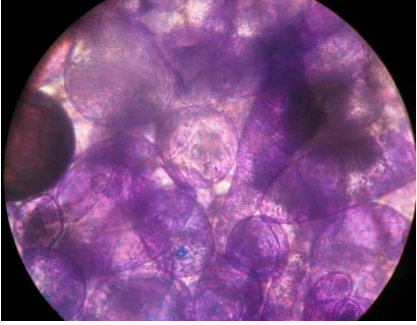




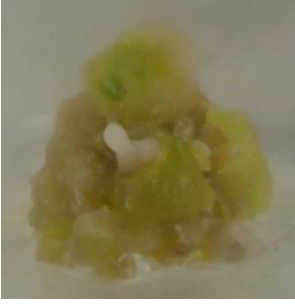
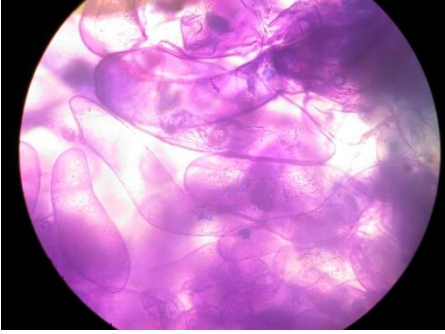



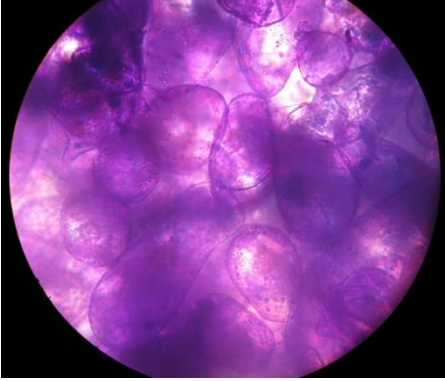
Figura 4.- Ejemplificación de la colocación de las muestras dentro de los pocillos.


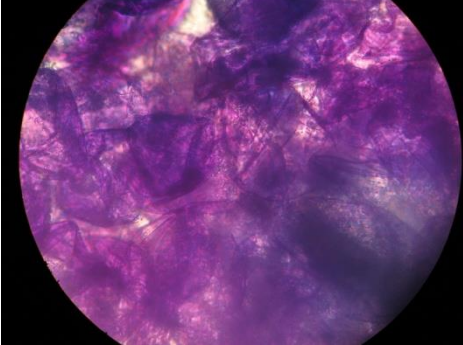

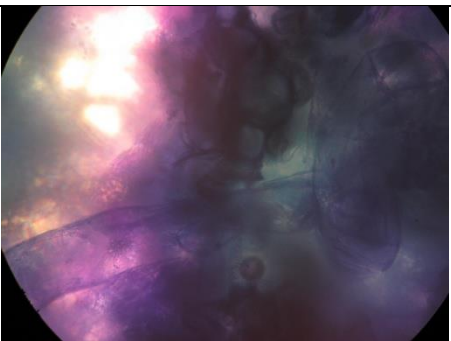

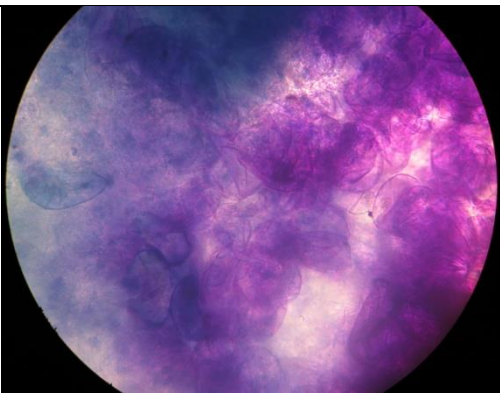
RESULTADOS

Resultados: aplicación de EMS a callos

Cuadro 9. - Observaciones a nivel macro y micro

Tratamiento	Características físicas externas	Observaciones	Características físicas de los tejidos vegetales (microscopio)
2		<p>Tratamiento sin EMS, crecimiento de masa 7.19 veces más el peso inicial, tejido verde y observación de células con sus organelos y de forma globular.</p>	
3		<p>Tratamiento con EMS (15mM/L), 2h, aumento de masa 7.72 veces más el peso inicial, tejidos verdes y observación de incremento en tamaño celular además de la presencia de formas torpedo en alguna de ellas</p>	
4		<p>Aplicación de EMS (15mM/L) por 4h, tejido verdes y algunos oscurecimientos por oxidación, incremento en masa 1.52 veces el peso inicial y formación</p>	

		de células muy largas con división celular	
5		Tratamiento con EMS (30mM/L) por 2h, tejidos verdes con matices blancos, observación celular amorfa y largos, en algunas células no se observa núcleo, incremento de masa 2.6 el peso inicial	
6		Tratamiento con EMS (30mM/L) por 4h, incremento en masa de 3.54 veces su peso inicial, tejido blanco y oxidado, formas celulares extremadamente largas presencia de sus organelos fuera de estas células alargadas	
7		Tratamiento con EMS (45mM/L) por 2h, tejidos verdes y presencia de oxidación, estructura celulares más grandes y formas irregulares similares a la etapa torpedo, pérdida de masa inicial de 5.7%	

<p>8</p>		<p>Tratamiento con EMS (45mM/L) por 4h, tejido blanquecino-oxidado, translucido y gelatinoso, estructuras celulares irregulares, aparentemente destrucción de la pared celular, pérdida de peso inicial de 74.6%</p>	
<p>9</p>		<p>Tratamiento con EMS (60mM/L) por 2h, tejido blanco y algunas zonas oxidado, estructura celular globular en cúmulos y estructuras muy grandes tipo bastón algunas formando una espiral, pérdida de peso inicial del 44.7%</p>	
<p>10</p>		<p>Tratamiento con EMS (60mM/L) por 4h, tejido blanco gelatinoso, estructura celular amorfa y aparentemente con destrucción de la pared celular, pérdida de peso inicial de 73.1%</p>	

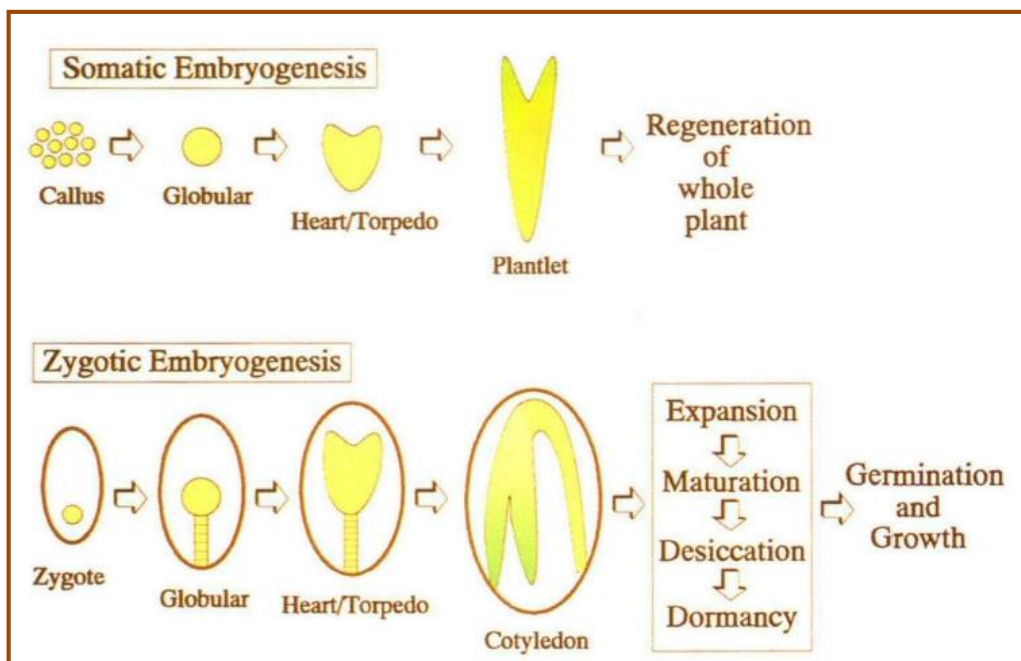


Figura 11.- Formas celulares previas a la formación de una nueva plántula (Zimmerman, 1992)
Referencia en la discusión de los resultados obtenidos en las imágenes tomadas al microscopio.

Cuadro 10.- Pesos de los callos antes y después de aplicar EMS

Numero de muestra	Peso inicial	Peso final	% de crecimiento en 45 días
2 ¹	0.519	3.604	694.4%
2 ²	0.585	5.065	865.8%
2 ³	0.624	3.744	600%
3 ¹	0.477	3.452	723.7%
3 ²	0.367	1.699	462.9%
3 ³	0.269	3.047	1,132.7%
4 ¹	0.312	0.869	278.5%
4 ²	0.244	0.189	77.45%
4 ³	0.362	0.374	103%
5 ¹	0.346	0.892	257.8%
5 ²	0.349	0.913	261.6%
5 ³	0.351	0.926	263.8%
6 ¹	0.183	0.111	60.6%
6 ²	0.249	1.145	459.8%

6 ³	0.289	1.577	545.6%
7 ¹	0.430	0.421	97.9%
7 ²	0.467	0.453	97%
7 ³	0.424	0.379	89.4%
8 ¹	0.365	0.043	11.7%
8 ²	0.168	0.012	7.1%
8 ³	0.321	0.185	57.6%
9 ¹	0.257	0.061	23.7%
9 ²	0.396	0.271	68.4%
9 ³	0.272	0.206	75.7%
10 ¹	0.226	0.015	6.63%
10 ²	0.247	0.024	9.7%
10 ³	0.293	0.189	64.5%

Efecto de la exposición de callos a EMS en la regeneración de plántulas

Observamos que las muestras de callos de *agave americana L.* con más tiempo de residencia (4h) fueron las más afectadas por oxidación, cambios de color en la pigmentación (blanco), reducción en peso-masa así como la presencia de formas celulares desiguales en algunos casos amorfas y relativamente grandes o largas.

Aimée et al. (2012) reporta, una diferencia significativa en la masa fresca de callo entre los tratamientos que se observaron después de 8 semanas de la cultura y fueron más claros a las 10 y 12 semanas, los tratamientos de baja gravedad (8 y 16,1 mM EMS) no inhibe significativamente el aumento de la masa fresca de callo cuando se compara con la control sin tratar y los tratamientos de alta severidad dan lugar a la necrosis de callo. En la caña de azúcar, el EMS 40 mM durante 2,5 horas se reportó como el óptimo tratamiento para la producción de plantas tolerantes al herbicida. Sin embargo en B. Bhagwat et al. (1998) Maneja tiempos de residencia más cortos (30 y 60 min) con concentraciones de 300 y 100mM de EMS resultando así una disminución en la supervivencia cuando se aumento de 100 a 300mM por lo tanto en la concentración más baja con ambas duraciones del

tratamiento dio lugar a una mayor formación de callos un que la tasa de regeneración de brotes era más baja que en los controles y un gran número de ápices se mantuvo inactivo. Los hongos producen metabolitos tóxicos que están involucrados en la patogénesis de la planta. En los cultivos de plantas in vitro de genotipos tolerantes y/o susceptibles varían en su respuesta a estos compuestos, haciendo de este modo tales fitotoxinas útil en las estrategias de selección in vitro para la tolerancia a la enfermedad. En este sentido, el establecimiento de una apropiada concentración de fitotoxina que afecta negativamente a las células, tejidos, órganos y plantas completas aumenta la probabilidad de la obtención de líneas tolerantes. Cepas de *Fusarium spp.* Filtradas y toxinas purificadas se han utilizado ampliamente en el callo (Tendekai et al. 2012).

Resultados: electroforesis SDS-PAGE

Como podemos observar en la figura 10 los resultados de las muestras, el marcador de tamaño y la solución estándar de BSA demuestran estar presentes sin embargo se observa un deslizamiento oblicuo que debería denotarse como bandas rectangulares; por lo tanto el resultado de las primeras pruebas son la pauta para las modificaciones que se dieron posteriormente dentro de este trabajo.

Cuadro 11.- Colocación de muestras en el gel de electroforesis

No. De pocillo	Características de la muestra
1	En el primer pocillo se coloca el marcador de tamaño 5µL
2	Muestra de BSA estandarizado 15µL
3	Muestra 1 diluida de chipilín 15µL
4	Muestra 2 diluida de chipilín 15 µL
5	Muestra de callo de 1g con Laemmli 1X, 15 µL
6	Moringa 1g con Laemmli 1X, 15 µL
7	Muestra de Callo 1g con Laemmli 2X, 15 µL
8	Muestra de moringa 1g con Laemmli 2X, 15 µL

Los resultados de esta tabla denotan que existe la presencia de proteínas en las muestras de hojas frescas sin embargo en callos no se logran divisar bandas, observar en la figura 10. En las figuras 6, 7 y 8 se ejemplifico con muestras de Moringa (*Moringa Oleifera*), Canavalia (*Canavalia Ensiformis*) y Chipilín (*Crotalaria longirostrata*) como deberían de ser los resultados en SDS-PAGE para callos, de esta forma también confirmamos el optimo funcionamiento de la cámara y la técnica aun inapropiada para la extracción de proteínas en los callos no manifiestan sobre el gel bandas respectivas a su peso molecular.

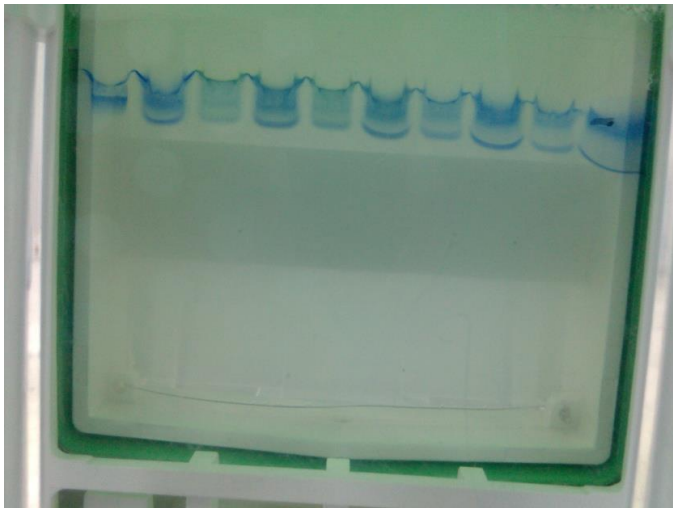


Figura 5.- Imagen al comienzo de la corrida



Figura 6.- primera corrida intercalada de chipilín y callos de agave

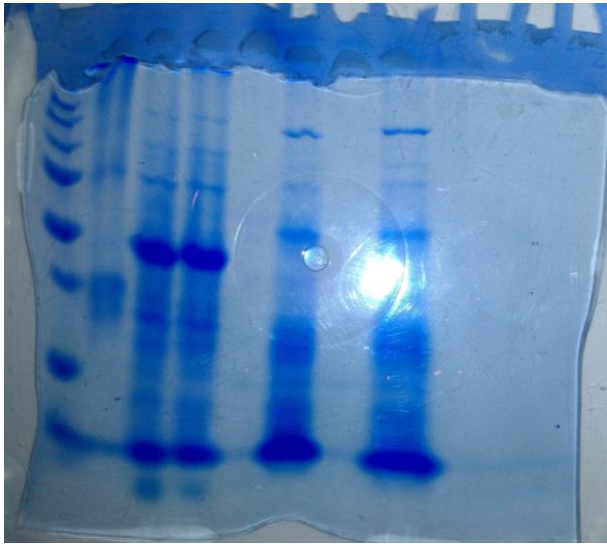


Figura 7.- corrida con alumnos de licenciatura

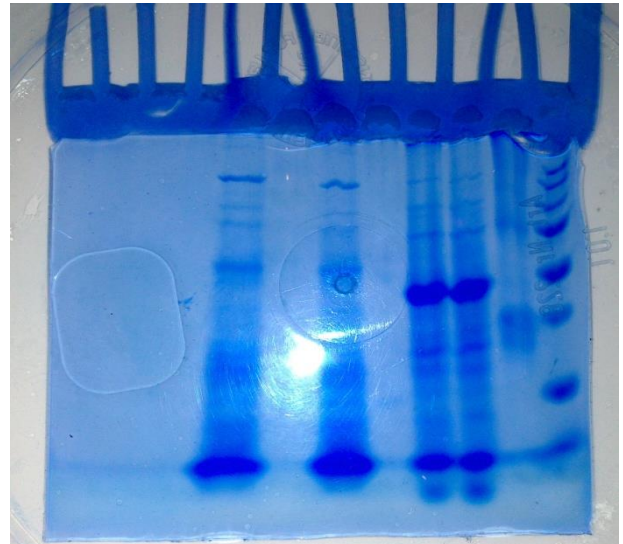


Figura.- 8 segunda imagen corrida de chipilín a diferentes concentraciones



Figura 9.- tabla referencia de pesos moleculares con la cámara Bio-rad



Figura 10.- Gel de la primera electroforesis bajo condiciones de: 100volts/15min y 80 volts/60min

CONCLUSIONES

Se acepta en general que la frecuencia de mutaciones aumenta con un incremento en la dosis de EMS sin embargo, la supervivencia de los tejidos tratados y la capacidad para regenerar plantas a partir de tales tejidos disminuyen asimismo en las plantas de propagación vegetativa, puede ser imposible separar mutaciones desfavorables por el cruzamiento o cruzamiento de retorno ya que estas plantas pueden ser estériles como es el caso de las variedades de banano Cavendish (Bhagwat et al. 1998).

Un atributo de EMS que hace que sea un mutágeno popular es su capacidad de inducir frecuencias de mutación altas y precisadas sin producir anomalías letales a los cromosomas (Waugh et al. 2006). Sin embargo, mientras que es importante reducir al mínimo efectos negativos durante un tratamiento mutagénico que se da debido a las altas concentraciones de EMS, también es fundamental para alcanzar altas frecuencias de mutación, es por ello la variación de los tratamientos. Podemos concluir entonces que hasta el momento los tratamientos idóneos son el número 3 y 5 con concentraciones de 15 y 30mM de EMS respectivamente y con un tiempo de residencia de 2 horas en ambos casos, dando así rendimientos en aumento de masa por encima de dos veces el peso inicial y con menores cambios en morfología vegetal. Debido a la carencia de tiempo este proyecto no llevo a concluir con el establecimiento de la técnica para el análisis de electroforesis SDS-PAGE, se mantuvo a nivel experimental ambos métodos de extracción de proteínas citados en el apartado de metodología sin observar ni una sola vez bandas que evidenciaran el peso de las proteínas de los callos.

REFERENCIAS

Apuya NR, Zimmerman JL. Heat Shock Gene Expression Is Controlled Primarily at the Translational Level in Carrot Cells and Somatic Embryos. *Plant Cell*. 1992 Jun;4(6):657–665. [PMC free article] [PubMed]

Aimée C. Koch K. & Sumita S. Ramgareeb & R. Stuart S. Rutherford & Sandra S. J. Snyman & M. Paula P. Watt (2012). An *in vitro* mutagenesis protocol for the production of sugarcane tolerant to the herbicide imazapyr, *The Society for In Vitro Biology*, *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant* (2012) 48:417–427 DOI 10.1007/s11627-012-9448-x

Arraiza N.Arraiza, P.M. Viguria. J.Navarro, A. Ainciburu. (2014). COORDINADORES, Historia, descripción y uso del microscopio óptico. MANUAL DE MICROSCOPIA, conculatado el 26 de junio de 2014, se en encuentra en la página: pagina.jccm.es/museociencias/.../manual%20de%20microscopia.pdf

Bhagwat B. Bhagwat & E.J. Duncan, Mutation breeding of banana cv. Highgate (*Musa* spp., AAA Group) for tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense using chemical mutagens (1997), Department of Plant Science, The University of the West Indies, St. Augustine, Trinidad and Tobago, *Scientia Horticulturae* 73 1998. 11–22

Bian F.uhua Bian & Caixia C. Zheng & Funing F. Qu & Xueqin X. Gong & Cuirong C. You, (2009), Proteomic Analysis of Somatic Embryogenesis in *Cyclamen persicum* Mill, *springer*, *Plant Mol Biol Rep* 28:22–31 DOI 10.1007/s11105-009-0104-5

“Buscan denominación de origen del Comiteco” Carlos Díaz publicado el 10/05/2013. Disponible en <http://noticiasnet.mx/portal/chiapas/general/150811-buscan-denominacion-origen-del-comiteco>. Recuperado el 20 de octubre de 2013

CESAPEG, (2007), campaña de manejo fitosanitario de Agave, comité estatal de sanidad vegetal Guanajuato, disponible en: www.cesaveg.org.mx

Chen K.an Chen, H.ai-J.un Wu, J.ian-F.eng Chen, X.iao-F.ang Cheng, X.iao J.ing &and X.in-.Yu Wang (2011), Somatic embryogenesis and mass spectrometric identification of proteins related to somatic embryogenesis in *Eruca sativa*, *Korean Society for Plant Biotechnology and Springer*, Plant Biotechnol Rep (2012) 6:113–122 DOI 10.1007/s11816-011-0203-2

“Convenios de colaboración del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez-Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica”. Disponible en <http://www.ittuxtlagutierrez.edu.mx/mcibq/8.html>

FIBAO glosario de Biología molecular, La proteómica, fecha de modificación 07/12/2007, disponible en internet en: <http://medmol.es/glosario/75/>

Ma. Esther de la Rosa y Lena Ruiz Azuara, (1997), Mutagénesis y Carcinogénesis ambiental, Capítulo 6, Departamento de Química Inorgánica y Nuclear UNAM, Pág. 82-84.

Emilio Fernández Reyes y Aurora Galván Cejudo, apartado 27. Métodos para la cuantificación de proteínas, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba

Griffin DM. 1973. Ecology of Soil Fungi. Chapman & Hall, Londres. pp. 57, 90, 135.

“Hacia el rescate del agave comiteco”. El Faro, año VIII, no. 87, pág. 7-9, 5 de junio 2008.

Jain SM (2010) In vitro mutagenesis in banana (*Musa spp.*)improvement. Acta Hort 879:605–614

Kumer Monokesh M. Kumer Sen., Shamima S. Nasrin, Shahedur S., Rahman R. &and Abu Hena H. Mostofa M. JamalJ.. (2014), In vitro callus induction and plantlet regeneration of

Achyranthes aspera L., a high value medicinal plant. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, Asian Pac J Trop Biomed 2014; 4(1): 40-46

Li Tingting T. Li a, Jianrong J. Li b, Wenzhong W. Hu a, Jinru J. Chen c, Hongjun H. Li., Protein changes in post mortem large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) monitored by SDS-PAGE and proteome analysis, (2013), *Food Control* 41 (2014) 49e55, journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont.

Laemmli, UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680.

Mahlanza Tendekai T. Mahlanza, R. Stuart S. Rutherford, Sandy S. J. Snyman & Paula P. Watt (2013), *In vitro* generation of somaclonal variant plants of sugarcane for tolerance to *Fusarium sacchari*, *Plant Cell Rep* (2013) 32:249–262 DOI 10.1007/s00299-012-1359-0

Marion M Branford, 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein- Dye binding, *Analytical Biochemistry* 72, páginas 248-254

Mao XiaoyingX. Mao, Yufei Y. Hua and Guogang G. Chen, (2014), Amino Acid Composition, Molecular Weight Distribution and Gel Electrophoresis of Walnut (*Juglans regia* L.), *International Journal of Molecular Sciences*, *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 2003-2014; doi:10.3390/ijms15022003

Peña Sobarzo Patricia, 2008, Hacia el rescate de Agave Comiteco, Artículo, *El Faro*, numero 87, páginas 6,7 y 8.

Seifert K. 2001. *Fusarium* and anamorph generic concepts. pp. 15 - 28 en: *Fusarium*. Summerell BA et al., eds. APS Press. St. Paul, Minnesota

Tapia Raúl R. Tapia, Ramiro. Castillo, Nadina N. Nieves, María M. A Blanco, Justo J. L González, Margelys M. Sánchez & Yania Y. Rodríguez (1999); Inducción, Maduración Y Encapsulación De Embriones Somáticos De Caña De Azúcar (*Saccharum Sp.*) Var Cp 5243, *Biotecnología Aplicada*; Vol. 16 No. 1, pp.20 – 23. Disponible en: <http://bioline.org.br/request?ba99005>

Verónica Moral Dardé, (2008), proteómica cardiovascular: análisis Proteómico de plasma y monocitos circulantes humanos en pacientes con síndrome coronario agudo, Tesis, universidad complutense de Madrid facultad de ciencias biológicas Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, pag.14-20.

Waugh R, Leader DJ, McCallum N, Caldwell D (2006) Harvesting the potential of induced biological diversity. *Trends Plant Sci* 11:1360–1385