

080380739

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EFFECTO DEL AMINOACIDO L - PROLINA, EN LA EMBRIOGENESIS
SOMATICA EN 3 VARIEDADES Y UNA LINEA EXPERIMENTAL
DE ALFALFA (*Medicago sativa*. L)

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA
P R E S E N T A
GLORIA FLORES ARAMBULA
GUADALAJARA, JAL. MARZO DE 1993

TITULO

EFFECTO DEL AMINOACIDO L-PROLINA, EN LA EMBRIOGENESIS
SOMATICA EN 3 VARIEDADES Y UNA LINEA EXPERIMENTAL DE
ALFALFA (Medicago sativa. L)

DEDICATORIA.

Con todo mi cariño a mi madre a quién admiro y agradezco el apoyo y confianza que depositó en mi.

A mi esposo e hija por motivarme a seguir adelante.

Gracias por creer en mi.

AGRADECIMIENTOS.

Quiero expresar mi gratitud.

A mi director de tesis Dr. Eulogio Pimienta Barrios, por el apoyo y guía que me brindó. Así mismo al Dr. Benjamin Rodriguez Garay jefe del Departamento de Cultivos Vegetales, mi reconocimiento por su valiosa asesoría y apoyo. Al Dr. Gonzalo Flores Martinez por sus sugerencias para la realización de este trabajo.

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. por la ayuda brindada para el desarrollo de esta tesis en sus instalaciones.

A las personas que de alguna forma colaboraron en la realización de esta tesis.

INDICE

	PAG.
I. INTRODUCCION.	1 - 2
II. ANTECEDENTES.	3 - 7
III. HIPOTESIS.	8
IV. OBJETIVO.	9
V. MATERIALES Y METODOS.	
VI. Material biológico	10
V.2 Medios de cultivo	10 - 11
V.3 Diseño experimental	12 - 13
V.4 Obtención de explantes asépticos	14
VI. RESULTADOS.	
VI.1 Atcyac	22 - 27
VI.2 Mesilla	28 - 32
VI.3 Florida	33 - 37
VI.4 Línea experimental 7-S-92	38 - 41
VII. DISCUSION.	42 - 44
VIII. CONCLUSIONES.	45
IX. BIBLIOGRAFIA.	46 - 49
X. APENDICE.	50 - 70

I. INTRODUCCION

La biotecnología es un área de la biología que ha tenido un desarrollo importante en los últimos años. Esta área tiene que ver con cualquier proceso de tipo productivo que se efectue a través de la acción de un organismo vivo, desde las bacterias hasta los animales superiores. El ámbito de acción de la biotecnología es grande y lo vemos diariamente en actividades relacionadas con la alimentación, salud, agricultura etc. (Robert y Loyola, 1985; Sánchez, 1985; Quintero, 1985; Strach, 1989; Rodríguez-Garay y Rubluo, 1992). Algunas de las aplicaciones prácticas en la agricultura destacan la preservación de germoplasma, obtención de metabolitos secundarios, obtención de plantas libres de microorganismos patógenos, mejoramiento genético, propagación masiva de plantas entre otros. Algunas de estas aplicaciones se han logrado a partir de la clonación, el cultivo de células haploides, el cultivo y fusión de protoplasto, formación de embriones somáticos etc. (Binwell, 1983; Quintero, 1984; Robert y Loyola, 1985; Hartmann y Kester, 1989).

La formación de embriones somáticos ofrece la posibilidad de obtener variaciones genéticas deseables y poder seleccionar genotipos que reúnan características necesarias para afrontar problemas que en la actualidad afectan las actividades agropecuarias, como el estrés, la sequía, heladas, enfermedades, plagas y salinidad entre otras. Es por esto, que se propuso un

estudio de embriogénesis somática con una especie forrajera como alfalfa, como una alternativa para tratar de obtener alguna línea con características deseables y solucionar algunos problemas de salinidad.

II. ANTECEDENTES

La variación genética constituye la materia prima de los organismos vivos sobre los cuales ha influido la evolución natural y/o la evolución dirigida de los vegetales que el hombre ha realizado para su beneficio (Rodríguez-Garay y Rubluo, 1992).

La variación somaclonal se ha constituido en una alternativa que puede ser aprovechada en el mejoramiento genético. Este fenómeno ha sido estudiado en un gran número de especies cultivables y dependiendo del tejido de origen, se denomina: variación gametoclinal (gametos), protoclinal (cloroplastos), mericlinal (meristemos) ó somaclonal (células somáticas), (Villalobos, 1985; Hartmann y Kester, 1989; Rodríguez-Garay y Rubluo, 1992).

Los complejos eventos que conducen a la formación de embriones somáticos, requieren una expresión ordenada de diversos estímulos morfogénéticos. Estos eventos incluyen la inducción y activación de células totipotentes, en un proceso de desarrollo en el cual se produce un embrión a partir de una célula, el cual guarda bipolaridad como ocurre en la embriogénesis y finalmente produce una planta completa, (Tisserat *et al.* 1979; Hartmann y Kester, 1989).

Existen 2 factores al intentar obtener embriones somáticos

- a) El factor genotípico, el cual es decisivo en muchas especies para lograr la embriogénesis somática, como ocurre en la alfalfa (Saunders et al. 1975; Phillips, 1983; Brown y Atanassov, 1985; Meijer y Brown, 1985), en maíz y otros cereales (Lu et al. 1982; Ammirato, 1989).
- b) Condiciones ambientales y de cultivo, indispensables para lograr este tipo de regeneración.

La embriogénesis somática pasa por tres estadios de desarrollo bien definidos: globular, forma de corazón, torpedo y finalmente una planta (Figura 5.2).

La embriogénesis somática sigue dos rutas embriogénicas.

- a) En la embriogénesis directa, los embriones se inician directamente de tejidos en ausencia de callo (lograndose fidelidad clonal).
- b) En la embriogénesis indirecta, se presenta inicialmente proliferación de células (callo) y posteriormente la formación del embrión (Tisserat et al. 1979; Ammirato, 1983; Rodríguez-Garay y Rubluo, 1982).

El fenómeno de embriogénesis somática se observó por primera vez en cultivos de zanahoria (Daucus carota). De tejidos de

zanahoria se tomaron explantes que fueron colocados en un medio suplementado con agua de coco, lo cual indujo la diferenciación celular, a partir de la cual se generó una masa de células desorganizadas (callos). El tejido de callo fué posteriormente a un segundo medio de cultivo para la iniciación de embriones, (Tisserat et al. 1979; Hartmann y Kester, 1969).

La inducción de embriones somáticos generalmente ocurre en medios con altas concentraciones de auxinas y la ausencia o baja concentración de estas permite el desarrollo y germinación de embriones (Walker et al. 1979; Ammirato, 1963; Stuart y Strickland, 1984a; Meijer y Brown, 1985; Skokut et al. 1985; Nolan et al. 1989; Rodríguez-Garay y Rubluc, 1992).

La observación de embriogénesis somáticas en cultivo de tejidos vegetales es un fenómeno relativamente reciente. Se han proporcionado evidencias de la formación de embriones somáticos en callos, suspensión celular y cultivos de protoplastos, iniciados de embriones inmaduros, inflorescencia juvenes u hojas de distintas especies de monocotiledoneas y dicotiledoneas. Como ejemplo destacan el maíz Zea mays (Lu et al. 1982), el girasol (Helianthus) y la papaya (Kamada et al. 1989).

Se reporta la regeneración de plantas por embriogénesis somática en diferentes especies de leguminosas forrajeras, (Medicago sativa, Trifolium pratense, Stylosanthes guyanensis).

El nivel de nitrógeno reducido adicionado al cultivo es uno de los factores más importantes en el control in vitro de embriogénesis somática. Según revisión de Walker y Sato (1981), Halperin y weatherell fueron los primeros en reconocer la importancia del amonio en el desarrollo de cultivo de zanahoria, el ión amonio y varios aminoácidos, particularmente la alanina y glutamina inducen la formación de embriones somáticos en cultivos en suspensión de zanahoria.

Se ha establecido que la alanina y la glutamina son superiores a amonio en presencia de nitrato y glutamina es mejor como único nitrógeno suplementado. En cultivos de alfalfa la formación de embriones somáticos es óptima a 12.5 mM de amonio (Walker y Sato, 1981; Skokut et al. 1985).

La embriogénesis somática en alfalfa ocurre bajo el estricto control del ión amonio en células inducidas para formar embriones (Stuart y Strickland, 1984b; Skokut et al. 1985).

Se ha observado que los aminoácidos ejercen dos efectos sobre la embriogénesis:

- 1.- La estimulación en el número de embriones somáticos
- 2.- Mejorar la calidad estructural de esos embriones (Stuart y Strickland, 1984a).

Los aminoácidos son compuestos orgánicos que contienen un grupo amino (NH_2) y un grupo carboxilo (COOH).

A la fecha el papel de los compuestos de nitrógeno reducido en la formación de embriones somáticos no se conoce.

Stuart y Strickland reportaron la respuesta de cultivos celulares de *M. sativa* a adiciones de aminoácidos en el medio de regeneración, utilizando un genotipo altamente regenerante como es el clon RA-2. El tamaño y conversión de embriones a plantas se incrementa por la utilización de aminoácidos. Los aminoácidos, prolina, alanina, glutamina, arginina, lisina, serina, asparagina y ortinina estimulan el número de embriones somáticos formados en cultivos de alfalfa (Stuart y Strickland, 1984a).

La prolina fué el aminoácido que más estimuló la embriogénesis somática en cultivos de alfalfa en relación a otros aminoácidos. En particular, la estimulación de embriogénesis somática por prolina muestra una interacción sinérgica con el amonio. Los embriones pueden ser incrementados con L-prolina en el medio de cultivo Schenk e Hildebrandt (SH), como resultado de optimización de la concentración de amonio y simultáneamente de la prolina (Stuart y Strickland, 1984b).

III. HIPOTESIS

EL AMINOACIDO L-PROLINA ESTIMULA LA DIFERENCIACION DE EMBRIONES SOMATICOS EN DIFERENTES ESPECIES VEGETALES POR LO TANTO, ES DE ESPERARSE ESTIMULO EN LA CANTIDAD Y CALIDAD DE EMBRIONES QUE SE FORMEN EN TEJIDOS SOMATICOS in vitro DE Medicago sativa.

IV. OBJETIVO

EVALUAR EL EFECTO CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE LA ADICION DE L-PROLINA EN LA EMBRIOGENESIS SOMATICA DE 3 VARIEDADES Y UNA LINEA EXPERIMENTAL DE Medicago sativa L. ADAPTADAS A DIFERENTES CONDICIONES CLIMATOLOGICAS.

V. METODOLOGIA

V.1 Material Biológico

Se utilizaron semillas de alfalfa (Medicago sativa) de las variedades: "Mesilla", "Florida", "Atoyac" y la línea experimental 7-S-92. Las primeras dos variedades y la línea experimental provienen de los Estados Unidos de Norteamérica, mientras que la variedad Atoyac proviene, de la región de Sayula, Jalisco.

V.2 Medios de Cultivo

Se utilizó el medio de cultivo basal SH desarrollado por Schenk y Hildebrant (1972) modificado por Walker y Sato (1981) complementado con 8 g/lit de agar y pH ajustado a 5.8 ± 0.05 con NaOH y HCl 1N. En la tabla 5.1 se sumarizan los medios de cultivo utilizados.

Los medios de cultivo así como la cristalería, agua, frascos, papel, etcétera fueron esterilizados en autoclave automática a 121°C, a 15 libras de presión, durante 15 minutos. Los medios de cultivo esterilizados se vaciaron en cajas petri de plástico de 90 x 15 mm. en una campana de flujo laminar horizontal marca VEKO.

TABLA 5.1.- Concentraciones de los reguladores de crecimiento en los medios de cultivo.

Medio de cultivo		Reguladores de crecimiento	
		(mg/lit.)	
SH G	Germinación	Sin reguladores de crecimiento	
SH A	Producción de callo	0.06 Pic. + 0.1 Ba.	(Phillips, 1983)
SH B	Inducción embriogénica	2, 2,4-d +2 ANA + 2 Kin.	(Phillips, 1983)
SH C	Inducción embriogénica	0.01 2,4-d + 2 Ade.	(Phillips, 1983)
SH D	Expresión de embriones	Sin reguladores de crecimiento	(Phillips, 1983; Stuart y Strickland, 1984)
SH DP	Expresión de embriones	----- + 50 mM de L-prolina	(Phillips, 1983; Stuart y Strickland, 1984)

2,4-d = Acido 2,4- Diclorofenoxiacético

Pic. = Picloram

Ba. = 6-Benziladenina

Ade. = Adenina

Kin. = Cinetina

ANA. = Acido-naftalenacético

----- = Sin reguladores de crecimiento

		Medios de expresión	
		S.P	C.P
Medios de Inducción	GHB	* * * * * * * * * *	* * * * * * * * * *
	GHC	* * * * * * * * * *	* * * * * * * * * *

Figura S.1. Número de réplicas por tratamiento.

S.P. - Sin prolina

C.P. - Con prolina

Los factores fueron el medio de cultivo para inducción y el medio de cultivo para la fase de expresión. Número 3. Se decidió emplear los datos de esta fase ya que se cree que el tiempo de respuesta de estos genotipos es confiable en esta fase del tratamiento.

V.4 Obtención de Explantes Asépticos.

V.4.1 Desinfección.

Para la obtención de explantes limpios de microorganismos (asépticos) primeramente se seleccionaron 25 semillas de las variedades "Mesilla", "Florida", "Atoyac" y la línea experimental "7-S-92"; las que se colocaron en bolsas de gasa y fueron lavadas con jabón líquido y enjuagadas con agua corriente. En condiciones asépticas se procedió a la desinfección, sumergiendo las semillas en alcohol etílico durante 1 minutos, enseguida se sumergieron en blanqueador comercial (50 %), al que se le adicionó 1 gota del surfactante tween "80", durante 10 minutos lo cual fué seguido de 4 enjuagues con agua estéril desionizada. Al término de la desinfección, las semillas fueron colocadas en cajas petri de vidrio conteniendo papel absorbente estéril con el fin de absorber el exceso de agua. Después se procedió a la siembra de las semillas.

V.4.2 Siembra.

Se colocaron 10 semillas por cada caja petri de plástico, conteniendo 1/10 de los componentes orgánicos e inorgánicos del medio de cultivo SH modificado por Walker y Sato (1981), sin reguladores de crecimiento. Cada caja de petri fué rotulada

y sellada con una película plástica autoadherible.

Posteriormente se incubaron en una cámara de incubación en la se mantuvo un fotoperiodo de 16 hr luz y una temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 2$ por un lapso de 7 días.

La manipulación de las semillas y explantes, se realizó con pinzas y bisturí, que fueron esterilizados exponiendolos a la flama de un mechero antes de cada operación para eliminar microorganismos indeseables en los instrumentos de trabajo.

V.5 Producción y Mantenimiento de Callos

La incubación de las resiembras se realizó bajo las condiciones antes mencionadas.

A las plántulas germinadas in vitro, se les disectó el hipocotilo (Figura 5.2), los que fueron sembrados en medio de cultivo SHA (Tabla 5.1), con el fin de inducir la formación de callo. Se realizaron 3 resiembras cada 30 días a medio de cultivo frescos, para inducir la proliferación de callos. En este medio se conservaron durante el tiempo de observación. Se tuvo especial cuidado de marcar cada callo, para identificar el genotipo del cual provenían.

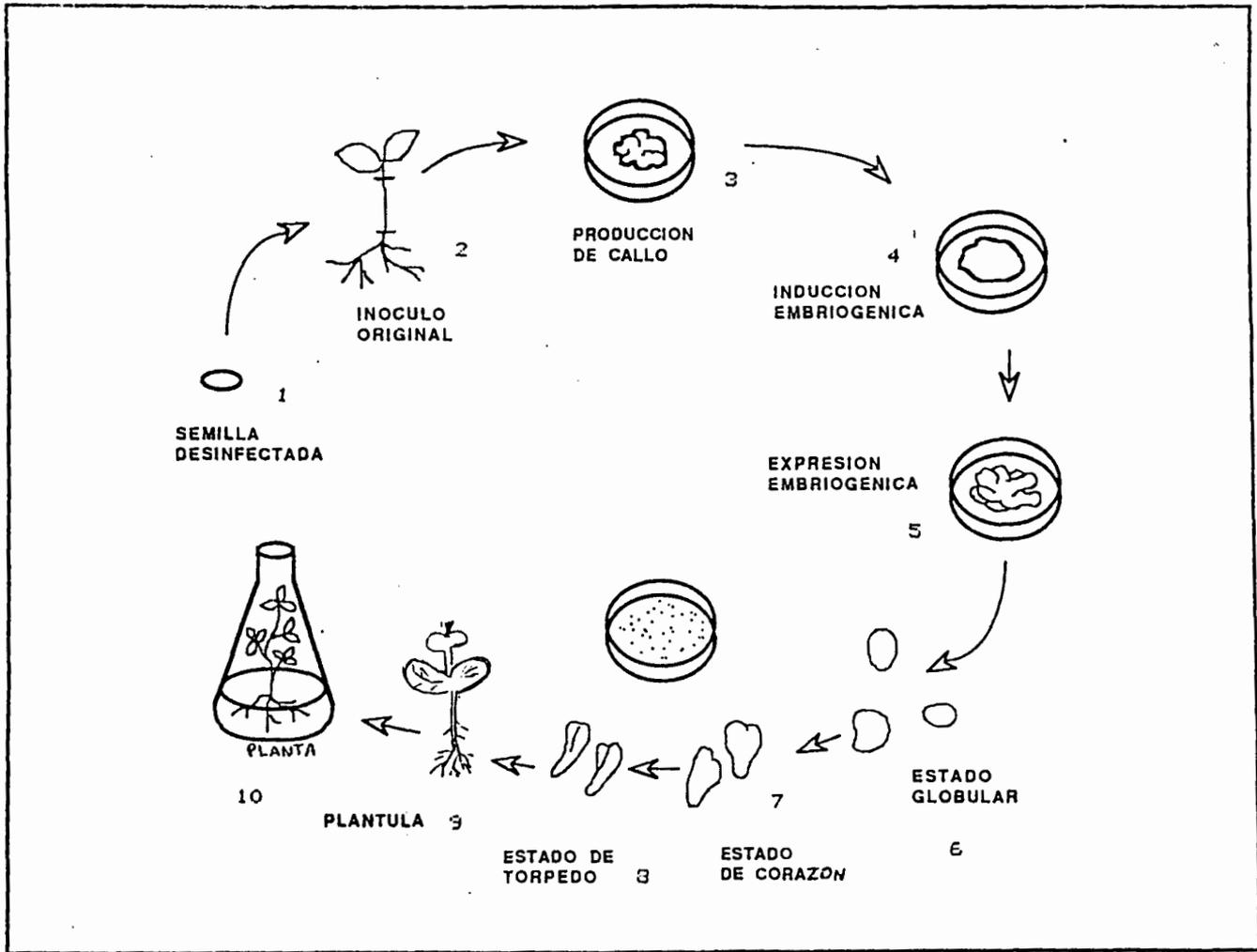


FIG. 5.2 - SECUENCIA DE EVENTOS EN LA EMBRIOGENESIS SOMATICA DE ALFALFA

V.5.1 Fase de inducción 1

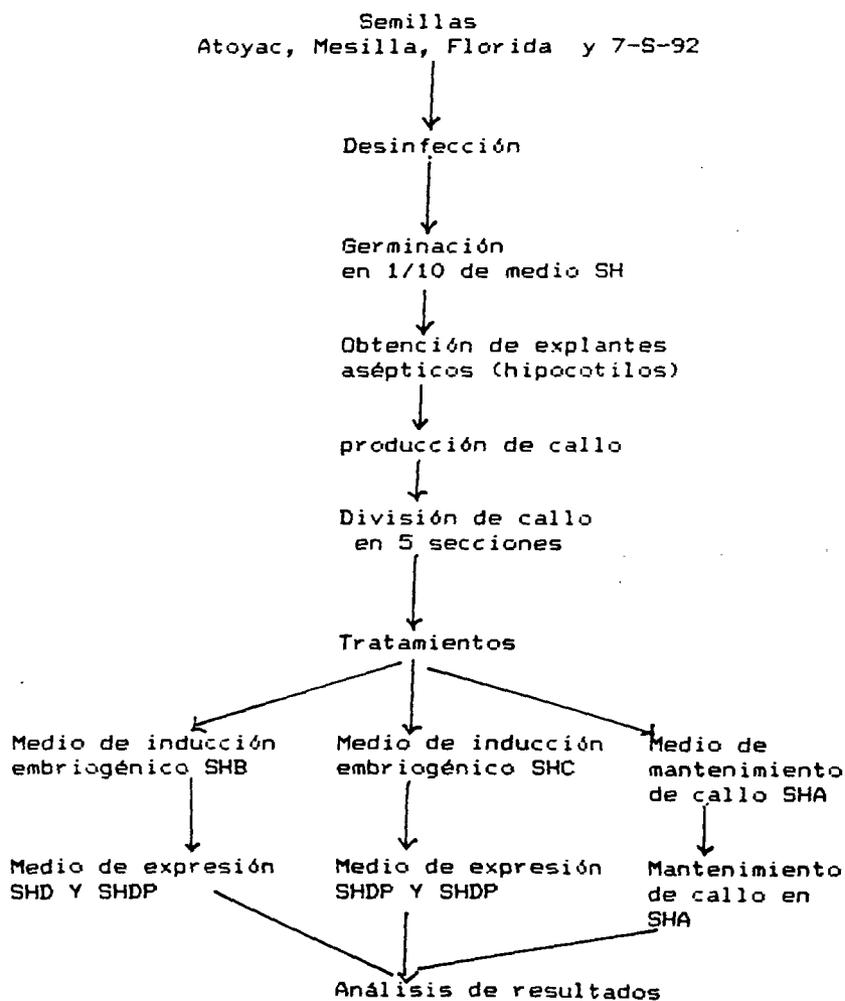
Cada uno de los callos fué dividido en cinco secciones, las que fueron seleccionados al azar para su posterior tratamiento. La primera sección del callo se colocó en medio SHA, con el fin de mantener la línea celular durante todo el experimento; las secciones 2 y 3 se colocaron en medio SHB; las secciones 4 y 5 se colocaron en medio SHC, estos últimos dos medios para inducción embriogénica y se incubaron por 30 días (Figura 5.3).

V.5.2 Fase de expresión 1

Al término del tiempo de inducción embriogénica, los callos se transfirieron a medio de cultivo SHD para expresión de embriones en ausencia total de reguladores de crecimiento; lo mismo se hizo para las secciones destinadas a tratamiento con L-prolina (SHDP), (Figura 5.3).

Con el propósito de intentar una vez más el proceso de embriogénesis somática e incrementar el número de embriones, se procedió a una segunda inducción y expresión, así como a una tercera y cuarta expresión para permitir la manifestación completa del proceso embriogénico.

FIGURA 5.3. ESQUEMA DE FLUJO UTILIZADO PARA LA OBTENCION EMBRIONES SOMATICOS DE ALFALFA



V.5.3 Fase de inducción 2

Los callos provenientes de la fase de expresión 1, se transfirieron a los medios de cultivo para inducción SHB y SHC de los cuales provenían inicialmente (Figura 5.3) y se mantuvieron en estos medios de cultivo durante 30 días.

V.5.4 Fase de expresión 2

Los callos que estuvieron en la segunda fase de inducción, fueron transferidos a los medios de expresión SHD y SHDP (Tabla 5.1). Los callos que en la primera expresión estuvieron en SHD se volvieron a resembrar en el medio SHD igual sucedió con los callos que estuvieron en SHDP (Figura 5.3).

V.5.5 y V.5.6 Fase de expresión 3 y 4

Se continuó con las fases de expresión 3 y 4, transfiriéndose los callos a medio SHD en ausencia total de reguladores de crecimiento con adición de 15 g/lit de carbón activado con el fin de evitar la oxidación por fenoles del tejido. Así mismo, se transfirieron callos al medio de cultivo SHDP con adición de 50 mM de L-prolina y 15 g/lit de carbón activado; esto por un lapso de 60 días en ambos medios de cultivo. Se efectuaron dos resiembras de 30 días en este lapso. (Figura 5.3).

El tamaño de los callos resebrados fué similar en todas las fases del proceso embriogénico (cuando el callo tuvo un tamaño mayor al resto, se procedió a eliminar al azar el exceso de masa celular, mediante cortes con la ayuda de un bisturí).

VI RESULTADOS

Las semillas de las variedades "Atoyac", "Mesilla", "Florida" y la línea experimental "7-S-92", presentaron alto porcentaje de germinación. Se obtuvieron plántulas de aproximadamente 4.5 cm de longitud en un lapso de 7 días.

El tiempo para la formación de callos de aproximadamente 3 cm de diámetro fué de 90 días, siendo de buen aspecto y manejables (friables), presentando un color paja y verde claro. En las primeras tres fases del experimento, los callos mantuvieron su color inicial, sin embargo, a partir de la fase dos cambiaron el color verde paja y verde claro al color amarillo mostaza. En la fase tres y cuatro este color se incrementó adquiriendo un color negrozco, que se acompañó por muerte celular (senescencia). Este proceso de senescencia no fué posible detenerlo con la adición de carbón activado. El estadio de desarrollo de los embrioides fué globular y corazón.

El crecimiento celular se incrementó notablemente durante las primeras tres fases del experimento, por lo que fué necesario eliminar al azar parte del exceso de callo, eliminando en esta porción algunos embrioides. En las fases tres y cuatro el crecimiento de los callos fué disminuyendo gradualmente.

Los genotipos que se mantuvieron en el medio de cultivo SHA al final del experimento presentaron embricoides en las tres variedades y la línea experimental "7-5-92", el estadio de estos fué globular. El color de los callos fué amarillo mostaza.

A continuación se presenta la respuesta embriogénica observada en las tres variedades comerciales y la línea experimental de alfalfa.

VI.1 Variedad "Atoyac".

En la primera fase de inducción (fase A) embriogénica se observaron pequeñas formaciones globulares no bien definidas, en ambos medios de inducción de embriones. Algunas de estas formaciones globulares observadas en la fase A se transformaron a embrioides en la primera fase de expresión.

El análisis de varianza realizado en la primera fase de expresión reveló diferencia estadísticamente significativa entre los medios de inducción, hecho que no ocurrió entre los medios de expresión (Tablas 6.1 y A-1). SHC presentó mayor respuesta embriogénica, que el medio SHB (Figura A-1). Sin embargo, entre los medios de expresión no existe diferencia estadísticamente significativa (Figura A-2).

En el segundo intento de inducción embriogénica se presentaron estructuras globulares en el medio de cultivo SHC y estructuras de tipo globular y pubescentes en el medio de cultivo

Tabla 6.1. Respuesta embriogénica en 3 variedades y una línea experimental de alfalfa.

Genotipo	Medio de cultivo	Expresión			
		1	2	3	4
"Aboyac"	Inducción	*	*	X	X
	Expresión	X	X	X	X
"Mesilla"	Inducción	*	*	*	X
	Expresión	X	X	X	X
"Florida"	Inducción	X	*	*	X
	Expresión	X	X	X	X
Línea "7-8-92"	Inducción	X	X	*	X
	Expresión	*	X	X	X

X.- No existe diferencia significativa ($p < 0.05$)

*.- Existe diferencia significativa ($p < 0.05$)

SHB. En la segunda fase de expresión algunas estructuras globulares se transformaron a embrioides.

El análisis de varianza realizado en la segunda fase de expresión de expresión, reveló diferencias estadísticamente significativas entre los medios de inducción. Entre los medios de expresión no se encontró diferencia estadística significativa (Tablas 6.1 y A-2). SHC presentó mayor respuesta embriogénica comparado con el medio SHB (Figura A-3); Sin embargo entre los medios de expresión no se registró diferencia estadística significativa con y sin prolina (Figura A-4). En la tercera fase de expresión se presentaron estructuras globulares y pubescentes en la mayoría de los genotipos en ambos medios de inducción. En esta fase el aspecto visual de los embrioides fué mejor con respecto a color y estructura en presencia de prolina. Algunos embrioides pubescentes y pocos globulares diferenciaron radícula en ambos medios de expresión. Esta tendencia se observó en mayor proporción en callos provenientes del medio de inducción SHB.

El análisis de varianza realizado reveló que no existe diferencia estadística significativa entre los medios de inducción, esto mismo se presentó para los medios de expresión (Tablas 6.1 y 6.2). SHC presentó mayor respuesta embriogénica con respecto al medio SHB (Figura 6.1) y numéricamente el mejor medio de expresión se presentó en ausencia de prolina

(Figura 6.2). Sin embargo, estadísticamente esta diferencia no es significativa (Tabla 6.1).

TABLA 6.2. Tabla de análisis de varianza para la respuesta embriogénica en la fase de expresión 3 en la variedad "Atoyac".

FUENTE	VARIACION	S.S.	g.l.	MS	F	P(F)
PROVENIENCIA		15.000	1	15.000	3.863	.054
EXPRESION		3.266	1	3.26	.841	.372
ERROR		217.466	56	3.88		
TOTAL (CORR.)		245.333	59			

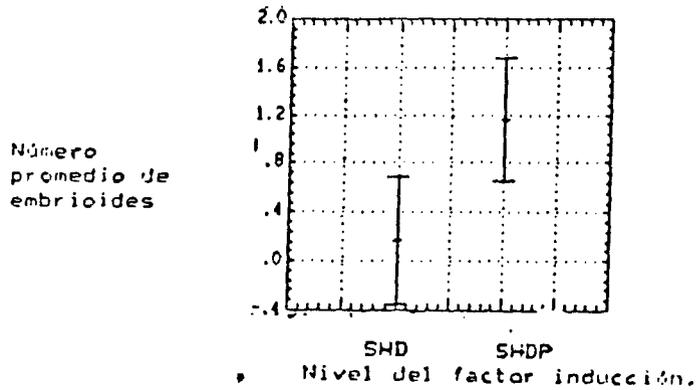


Figura 6.1. Intervalos de diferencia mínima significativa para el factor inducción en la fase 2 en la variedad "Atoyac".

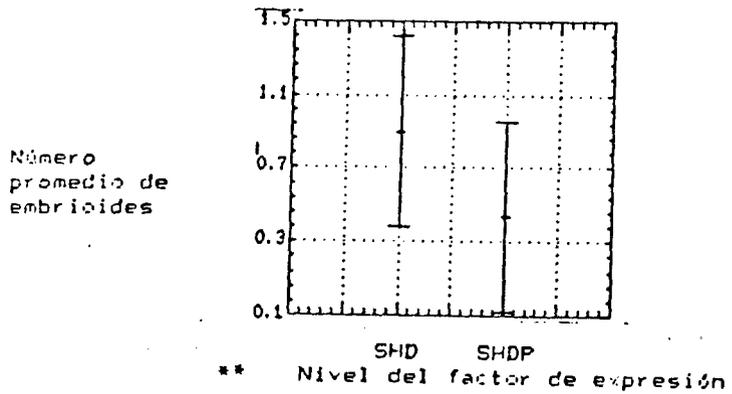


Figura 6.2. Intervalos de diferencia mínima significativa para el factor de expresión en la fase 3 en la variedad "Atoyac".

- * Medio de cultivo SHB y SHC (ver Tabla 5.1)
- ** Medio de cultivo SHD y SHDP (Tabla 5.1)

El análisis de varianza realizado en la cuarta fase de expresión, reveló que no existe diferencia estadística significativa entre los medios de inducción y expresión (Tablas 6.1 y A-3). En las Figuras A-5 y A-6 se presenta el número promedio de embrioides que se diferenciaron en los dos medios de inducción (SHB y SHC), lo cual revela que no existe diferencia estadística significativa entre ambos medios. Tendencia similar se observó entre los medios de expresión con y sin la suplementación de prolina.

VI.2. Variedad "Mesilla"

En la primera fase de inducción se presentó formaciones de tipo globular en los genotipos que estuvieron en el medio de cultivo SHC. En la primera fase de expresión el análisis de varianza muestra que existe diferencia significativa en los medios de inducción, no así entre los medios de expresión. Esto puede observarse en las Tablas 6.1 y A-4. Entre los medios de inducción SHB presenta mayor respuesta embriogénica con respecto al medio SHC (Figura A-7). Entre los medios de expresión tanto en ausencia como en presencia de prolina no se presentan diferencia estadísticas significativa (Figura A-8). En el segundo intento de inducción de embriones se presentaron estructuras globulares y pubescentes en los genotipos en ambos medios de inducción (SHB y SHC). En algunos genotipos las estructuras globulares se transformaron en embrioides en los dos medios de inducción. En la segunda fase de expresión de embriones se observó la transformación de algunas estructuras pubescentes en raíces las cuales provenían de ambos medios de inducción SHB y SHC. Así mismo, algunas estructuras globulares se transformaron a embrioides.

El análisis de varianza realizado en la segunda fase de expresión de embrioides, reveló diferencias estadísticas significativas entre los medios de inducción. Entre los medios de expresión no se encontró diferencia estadística (Tablas 6.1 y A-5). SHC presentó mayor respuesta embriogénica, que el medio SHB (Figura A-9). Sin embargo, entre los medios de expresión no existe diferencia estadística significativa (Figura A-10). En la tercera fase de expresión embriogénica algunas estructuras globulares y pubescentes se transformaron a embrioides y otras mas emitieron raíces; esto en mayor proporción en los genotipos provenientes del medio de inducción SHB. Los resultados del análisis de varianza muestran la influencia estadística significativa del medio de inducción en la expresión de los embrioides esto se observa en las tablas 6.1 y 6.3.

TABLA 6.3. Tabla de análisis de varianza para la respuesta embriogénica en la fase de expresión 3 en la variedad "Mesilla".

FUENTE DE VARIAC.	SS.	g.l	MS	F	P(F)
INDUCCION	138.016	1	138.016	5.148	.027
EXPRESION	10.416	1	10.416	.389	.542
ERROR	1528.150	56	26.809		
TOTAL (CORR.)	1676.583	59			

El promedio del número de embrioides registrados en los medios de inducción embriogénica, revelan que el medio SHC fué mejor con respecto al medio SHB (Figura 6.3). Entre los medios de expresión no se presentó diferencia estadística significativa (Figura 5.4).

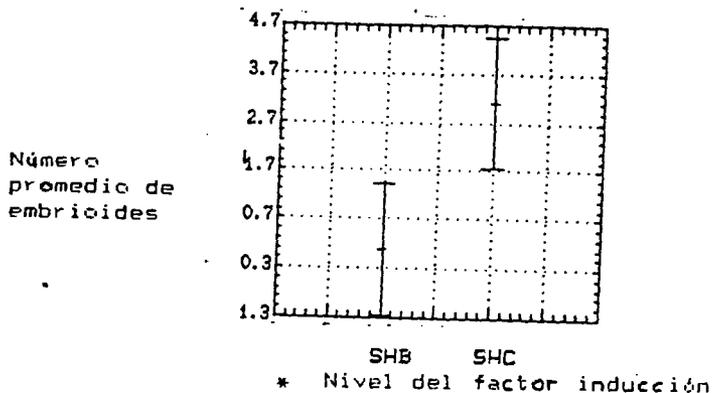


Figura 6.3. Intervalo de diferencia mínima significativa para el factor inducción en la fase 2 en la variedad "Mesilla".

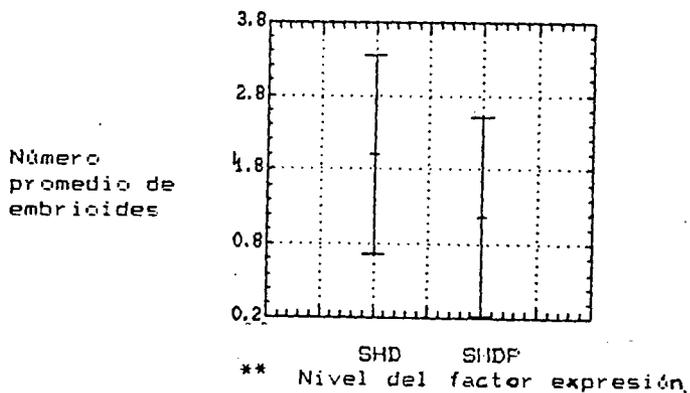


Figura 6.4. Intervalos de diferencia mínima significativa para el factor de expresión en la fase 3 en la variedad "Mesilla".

- * Medio de cultivo SHB y SHC (ver Tabla 5.1)
- ** Medio de cultivo SHD y SHDP (Tabla 5.1)

El aspecto visual de los embrioides fué ligeramente mejor en cuanto a estructura en el medio con prolina, ya que en algunos embriones se observó un mayor tamaño.

El análisis de varianza realizado en la cuarta fase de expresión, reveló que no existe diferencia estadística significativa entre los medios de inducción y expresión (Tablas 6.1 y A-6). En las Figuras A-11 y A-12 se presenta el número promedio de embrioides que se diferenciaron en los dos medios de inducción (SHB y SHC), lo cual revela que no existe diferencia estadística significativa entre ambos medios. Tendencia similar se observó entre los medios de expresión con y sin la suplementación de prolina.

También se manifestó gran crecimiento de raíces expresadas en fases anteriores. El aspecto de los embrioides fué de adelgazamiento.

VI.3 Variedad "Florida"

En la primera fase de inducción se presentaron formaciones de tipo globular en ambos medios de inducción (SHB y SHC). En la primera fase de expresión se manifestaron además de estructuras globulares, estructuras de tipo pubescentes principalmente de genotipos provenientes del medio SHC. El aspecto de los embrioides globulares se observó vigoroso mientras que, el de los pubescentes fué delgado y alargados.

El análisis de varianza realizado en la primera fase de expresión reveló que no existe diferencia estadística significativa entre los medios de inducción y expresión (Tablas 6.1 y A-7). En las Figuras A-13 y A-14 se presenta el número promedio de embrioides que se diferenciaron en los dos medios de inducción (SHB y SHC), lo cual revela que no existe diferencia estadística significativa entre ambos medios. Tendencia similar se observó entre los medios de expresión con y sin la suplementación de prolina. En el segundo intento de inducción de embriones se incrementaron las estructuras globulares y pubescentes principalmente en el medio de cultivo SHC. Algunas estructuras globulares se diferenciaron a embrioides en esta fase en ambos medios de inducción. En la segunda fase de expresión algunas estructuras pubescentes manifestadas en la fase anterior, se diferenciaron en radículas, en el medio sin prolina.

El análisis de varianza realizado en la segunda fase de expresión reveló diferencia estadística significativa entre los medios de inducción, no así entre los medios de expresión (Tablas 6.1 y A-8). SHC presentó mayor respuesta embriogénica, que el medio SHB (Figura A-15). Sin embargo, entre los medios de expresión no existe diferencia estadística significativa (Figura A-16). En la tercera fase de expresión se presentaron estructuras globulares y pubescentes en la mayoría de genotipos en ambos medios de inducción. Algunas estructuras globulares se diferenciaron a embrioides mientras que algunas pubescentes se diferenciaron a radículas, esta tendencia se observó en mayor proporción en callos provenientes del medio de inducción SHB.

El análisis de varianza realizado en la tercera fase de expresión reveló la diferencia estadística significativa entre los medios de inducción, no así entre los medios de expresión (Tablas 6.1 y 5.4). SHC presentó mayor respuesta embriogénica respecto al medio SHB (Figura 6.5). Sin embargo, entre los medios de expresión no existe diferencia estadística significativa (Figura 6.6).

TABLA 6.4. Tabla de análisis de varianza para la respuesta embriogénica en la fase de expresión 3 en la variedad "Florida".

FUENTE VARIAC.	SS	g.l	MS	F	P(F)
PROVENIENCIA	48.60	1	48.60	4.33	.04
EXPRESION	2.40	1	2.40	.214	.65
ERROR	638.73	57	11.20		
TOTAL (CORR.)	698.73	59			

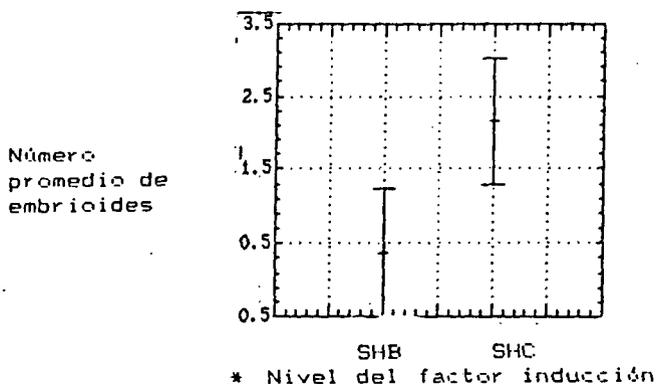


FIGURA 6.5. Intervalos de diferencia mínima significativa para el factor inducción en la fase 2 en la variedad "Florida".

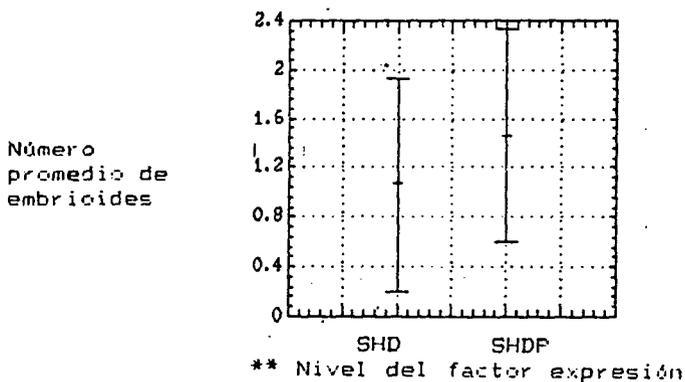


FIGURA 6.6. Intervalos de diferencia mínima significativa para el factor expresión en la fase 3 en la variedad "Florida".

* Medio de cultivo SHB y SHC (ver Tabla 5.1)

** Medio de cultivo SHD y SHDP (Tabla 5.1)

Las raices expresadas anteriormente continuaron desarrollandose en la cuarta fase de expresión.

El análisis de varianza realizado en la cuarta fase de expresión, reveló que no existe diferencia estadística significativa entre los medios de inducción y expresión (Tablas 6.1 y A-9). En las Figuras A-17 y A-18 se presenta el número promedio de embrioides que se diferenciaron en los dos medios de inducción (SHB y SHC), lo cual revela que no existe diferencia estadística significativa entre ambos medios. Tendencia similar se observó entre los medios de expresión con y sin suplementación de prolina.

VI.4 Línea experimental "7-S-92"

En la primera fase de inducción de embriones, los callos presentaron formaciones globosas únicamente en el medio de inducción SHB. En la primera fase de expresión se manifestaron formaciones globulares y pubescentes en ambos medios de inducción (SHB y SHC).

El análisis de varianza realizado en la primera fase de expresión reveló que existe diferencia estadística significativa entre los medios de inducción y expresión (Tablas E.1 y A-10). Entre los medios de inducción SHB presentó mayor respuesta embriogénica con respecto al medio SHC (Figura A-19). Entre los medios de expresión SHD presentó mayor respuesta embriogénica con respecto al medio SHDP (Figura A-20). En la segunda fase de inducción, se incrementaron las estructuras globulares y pubescentes en mayor proporción en el medio SHC. Algunas estructuras globulares se diferenciaron a embrioides en esta fase.

El análisis de varianza realizado en la segunda fase de expresión de embriones, reveló que no existe diferencia estadística entre los medios de inducción y expresión (Tablas E.1 y A-11). En las Figuras A-21 y A-22 se presenta el número promedio de embrioides que se diferenciaron en los dos medios de inducción (SHB y SHC), lo cual revela que no

existe diferencia estadística significativa entre ambos medios. Tendencia similar se observó entre los medios de expresión con y sin la suplementación de prolina.

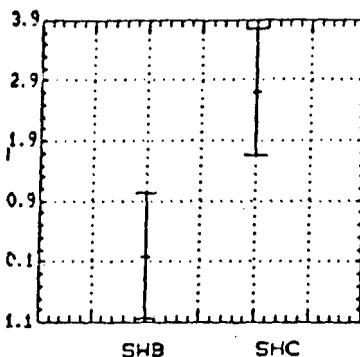
El análisis de varianza realizado en la tercera fase de expresión de embriones reveló la diferencia estadística significativa entre los medios de inducción, no así entre los medios de expresión (Tablas 6.1 y 6.5).

TABLA 6.5.- Tabla de análisis de varianza de respuesta embriogénica en la fase de expresión 3 en la línea experimental "7-S-92".

FUENTE VARIAC.	SS	g.l	MS	F	P(F)
INDUCCION	109.350	1	109.350	6.665	.012
EXPRESION	3.750	1	3.750	.229	.639
INTERACCION	3.750	1	3.750	.229	.639
INDUCC. X EXPRES.	3.750	1	3.750	.229	.639
ERROR	918.800	56	16.407		
TOTAL (CORR.)	1035.650	59			

El promedio del número de embrioides registrados en los medios de inducción embriogénica, revelan que el medio SHC fué mejor con respecto al medio SHB (Figura 6.7). Entre los medios de expresión no se presentó diferencia estadística significativa (Figura 6.8). En esta fase el aspecto visual fué ligeramente mejor en cuanto a estructura en el medio con prolina, ya que en algunos embrioides se observó mayor tamaño y grosor.

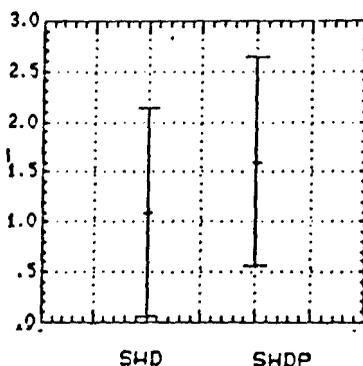
Número promedio de embríoides



* Nivel del factor de inducción

FIGURA 6.7. Intervalos de diferencia mínima significativa para el factor inducción en la fase 2 en la línea experimental 7-S-92.

Número promedio de embríoides



** Nivel del factor expresión

FIGURA 6.8. Intervalos de diferencia mínima significativa para el factor expresión en la fase 3 en la línea experimental 7-S-92.

- * Medio de cultivo SHB y SHC (ver Tabla 5.1)
- ** Medio de cultivo SHD y SHDP (Tabla 5.1)

El análisis de varianza realizado en la cuarta fase de expresión, reveló que no existe diferencia estadística significativa entre los medios de inducción y expresión (Tablas 6.1 y A-12). El número promedio de embrioides que se diferenciaron en los medios de inducción SHB y SHC, reveló que no existe diferencia estadística significativa entre ambos medios (Figura A-23). Tendencia similar se observó entre los medios de expresión con y sin la suplementación de prolina (Figura A-24). En esta fase los embrioides murieron.

VII. DISCUSION

Un factor importante para el inicio de cultivos celulares es la selección de la fuente de explante (Ammirato, 1989). Saunders et al. (1975) y Meijer y Brown (1985), mencionan que el hipocotilo es una buena fuente de explante para el inicio de cultivos celulares en alfalfa, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo. Así mismo, el medio de cultivo Shenck e Hildebrant con adición de picloram y benziladenina es óptimo para producción de callos de alfalfa, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Phillips (1983), quien utilizó este medio de cultivo para la formación de callo.

La respuesta más favorable para inducir embriones somáticos ocurre en un medio de cultivo con concentración baja de auxinas. Sin embargo, esto no concuerda con lo encontrado para alfalfa por Saunders (1975); Walker et al. (1978); Walker et al. (1979); Phillips, (1983); Meijer y Brown (1985) y Rodriguez -Garay y Rubluo (1992). Estos autores encontraron que la fase de inducción generalmente se obtiene cuando se adicionan al medio concentraciones relativamente altas de auxinas. Esto puede atribuirse al hecho de la presencia de una mayor sensibilidad fisiológica del tejido a ser inducido, lo cual puede atribuirse a que los niveles endógenos en los tejidos de alfalfa empleados son altos.

Generalmente la expresión de embriones somáticos ocurre en medios basales libres de reguladores de crecimiento (Walker et al. (1979); Walker y Sato (1981); Ammirato (1983); Phillips (1983); Stuart y Strickland (1984a); Skokut et al. (1985); Fujii; et al. (1989); Kamada, et al. (1989) y Rodríguez-Garay y Rubluc (1992)). Esto coincide con los resultados obtenidos en este trabajo. La expresión de embrioides somáticos dependió del tratamiento de inducción y al haber efecto acumulativo en las fases de expresión no se presentó diferencia significativa en el medio de expresión. Los embrioides expresados alcanzaron los estadios de desarrollo tempranos en forma globular y pubescentes, aunque la respuesta obtenida es variable y presenta un efecto genotípico importante, lo cual fué evidente por los resultados obtenidos en las diferentes especies de Medicago.

La adición de L-prolina al medio de expresión sin reguladores de crecimiento no estimuló la embriogénesis somática en las variedades "Atoyac", "Mesilla", "Florida" y la línea experimental "7-S-92" como se reportó para la línea RA-3 (Stuart y Strickland (1984b) y Skokut et al. (1985)), en la cual este aminoácido estimuló un 40 % el número de embriones somáticos. Esto puede explicarse a que se utilizó un genotipo con alto potencial o sensibilidad embriogénica y regenerante para su estudio. Otros genotipos altamente embriogénicos y regenerantes son "Falcata" y "RA-24". En los genotipos utilizados en este

trabajo no se reportan estudios previos utilizando aminoácidos para incrementar el número de embriones somáticos además generalmente existe variación entre y dentro de las variedades (Meijer y Brown, 1985).

La embriogénesis somática depende también del genotipo de alfalfa y de la fuente de nitrógeno (Skokut et al. 1985), a su vez el aminoácido L-prolina es altamente dependiente de amonio para la respuesta embriogénica; esto puede atribuirse a la respuesta sinérgica que se presenta cuando ambos se combinan (Stuart y Strickland, 1984b). En este estudio la concentración del ión amonio fue menor al que se empleó en este trabajo, lo cual puede ayudar, en parte a explicar los resultados obtenidos.

La calidad estructural de los embrioides se incrementa con adición de L-prolina en la variedad "Mesilla" y la línea experimental "7-S-92"; sin embargo, el tamaño y conversión a plátulas no se incrementa con L-prolina. En los trabajos reportados para alfalfa por Stuart y Strickland (1984a), se encontró que la adición de L-prolina y otros aminoácidos básicos (glutamina y arginina) y alanina, incrementan el efecto embriogénico. La muerte de la mayoría de los genotipos en las últimas fases del experimento, puede atribuirse al tiempo de exposición a L-prolina, o bien a la cantidad de carbón utilizado.

VIII. CONCLUSIONES

- El medio de proveniencia influye en la respuesta embriogénica

- El a.a L-prolina no incrementa la embriogénesis en las variedades "Atoyac", "Florida", "Mesilla" y la línea experimental "7-8-92".

- La embriogénesis depende del antecesor genético del material biológico.

- La sensibilidad fisiológica del tejido es importante para la respuesta embriogénica.

IX. LITERATURA CITADA

- Amminato P.V. 1983. Embryogénesis. In: Evans, D.A; W.R. Sharp; P.V. Ammirato and Yamada (eds). Handbook of Plant Cell Culture. Macmillan publishing Co., New York 1:82-111.
- Ammirato, P.V. 1989. Recent progress in somatic embryogenesis. Newsletter 57: 2-14.
- Binwell, R.G.S. 1983. Fisiología vegetal. Agt editor S.A, Kingston, Ontario Canada. 762 p.
- Brown, D.C.W. and A.Atanassov. 1985. Role of genetic background in somatic embryogenesis in Medicago. Plant Cell Tissue 4:11-122.
- Fujii, J.A.; D, Slade. and K. Redenbaugh. 1989. Maturation and greenhouse planting of alfalfa artificial seeds. In vitro Cell. Dev. Biol. 25: 1179- 1182.
- Hartmann, H.T. y D.E Kester. 1989. Propagación de Plantas. Edit. CECOSA. México, D.F. 618 p.
- Kamada, H.; K. Kobayas.; T. Kiyosue, and H. Harada. 1989. Strees induced somatic embryogenesis in carrot and its application to synthetic seed production. In vitro Cell. Dev. Biol. 25: 1163-1166
- Lu, C.; I.K. Vasil and P. Ozias- Akins. 1982. Somatic embryogenesis in Zea mays L. Theor. Appl. Genet. 62: 109-112.

- Meijer, E.G.M. and D.C.W. Brow. 1985. Screening of diploid Medicago sativa germplasm for somatic embryogenesis. Plant Cell Rep. 4:285-288.
- Nolan, K.E.; R.J. Rose. and J.R. Gorst. 1989. Regeneration of Medicago truncatula from tissue culture: increased somatic embryogenesis using explants from regenerated plants. Plant Cell Rep. 8: 278-281.
- Phillips, G.C. 1983. Screening alfalfas adapted to the southwester United States for regenerator for genotypes in vitro. 19 (3): 265p.
- Quintero, R.A. 1984. El cultivo de células vegetales y su aplicación a la producción de compuestos con actividad fisiológica. Rev. de la Soc. Quim. de Méx. 28 (3): 114-118.
- Quintero, R.A. 1985. Introducción al programa sobre el desarrollo de la biotecnología en México. En : Robert. M.L. y V.M. Loyola. (eds) CICYT. El cultivo de tejidos vegetales en Mexico. pp 15-20.
- Rodríguez- Garay, B. y A. Rubluo. 1992. Biotecnología Hoy En: Alvarez de la Cuadra, J> (ed). CONACYT-CIATEJ. 157 p.
- Robert, L.M. y V.M> Loyola. 1985. El cultivo de Tejidos Vegetales en México. En: Robert, L.M.; V.M. Loyola (eds). El Cultivo de Tejidos Vegetales en México. CONACYT. pp 21-26.

- Sanchez, R.S. 1985. El desarrollo biotecnológico en México. En: Quintero, R.A. (ed). Prospectiva de la Biotecnología en México. CONACYT. pp 131-148.
- Saunders, J.W. and E.T. Bingham. 1975. Growth regulator effects on bud initiation in callus cultures of Medicago sativa Emer. J. Bot. 62 (9): 850-855.
- Saunders, J.W.; E.T. Bingham.; L.V. Hurley and D.M. Kaats. 1975. Breeding alfalfa which regenerates from callus tissue in culture. Crop. Sci. 15: 719-721.
- Schenk, R.V. and A.C. Hildebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous Plant Cell Cultures. Can. J. Bot. 50: 119-204.
- Skokut, A.T.; J. Manchester. and J. Schaefer. 1985. Estimulation of somatic embryo production by amino acids and N-15 NMR determination of nitrogen utilization. Regeneration in alfalfa tissue culture Plant Physiol. 79: 579-583.
- Strach. M.S. 1989. Historia de la Biotecnología. Ciencia y Desarrollo. 16 (8): 27-29.
- Stuart, D.A. and S.G. Strickland. 1984a. Somatic embryogenesis from cell cultures of Medicago sativa L. I. The role of amino acid additions to the regeneration medium. Plant Sci. Lett. 34: 165-174.

- Stuart, D.A. and S.G. Strickland. 1984b. Somatic embryogenesis from cell cultures of Medicago sativa L. II. The role of amino acid additions to the regeneration medium. *Plant Sci. Lett* 34: 175-181.
- Tisserat, B.; E.B. Esan. and T. Murashige. 1979. Somatic embryogenesis in angiosperms. *Hort. Rev.* 1: 1-78
- Villalobos. A.V.M. 1985. Fundamentos teóricos prácticos de cultivo de tejidos vegetales. Centro de genética, colegio de postgraduados Montecillos, México. Primer curso FAD-México. de micropropagación vegetal. pp. 79-88.
- Walker, K.A.; P.C. Yu.; S.J. Sato. and E.G. Jaworski. 1978. The hormonal control of organ formation in callus of Medicago sativa L. cultured in vitro. *Amer. J. Bot.* 65 (6): 654-659.
- Walker, K. A.; M. L. Wendeln. and E.G. Jaworski. 1979. Organogenesis in callus tissue of Medicago sativa L.: the temporal separation of induction processes from differentiation processes. *Plant Sci. Lett.* 16: 23-30.
- Walker, K. A.; and S.J. Sato. 1981. Morphogenesis in callus tissue of Medicago sativa : The role of ammonium ion in somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. and Org. Cult.* 1: 110-122.

TABLA A-1. Tabla de análisis de varianza de respuesta embriogénica en la fase de expresión 1 en la variedad "Atoyac".

FUENTE DE VARIACION	S.S	g.l	MS	F	P(F)
INDUCCION	36.816	1	36.816	4.438	.039
EXPRESION	22.816	1	22.816	2.751	.102
INTERACCION	2.016	1	2.016	.243	.629
INDUCC. X EXPRES.	2.016	1	2.016	.243	.629
ERROR	464.533	56	8.295		
TOTAL	526.183	59			

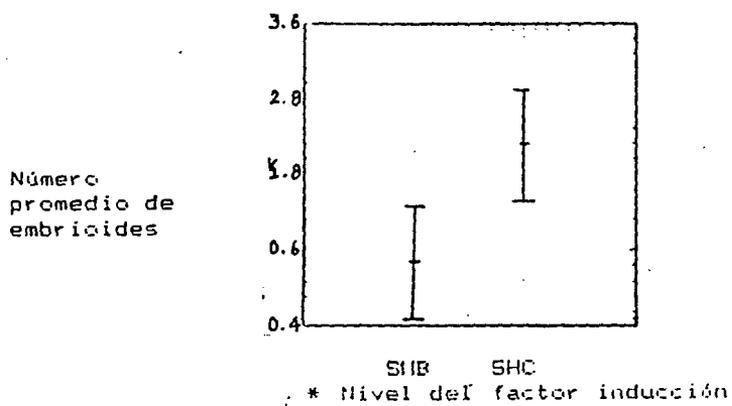


FIGURA A-1. Intervalos de diferencia mínima significativa para el factor inducción en la fase I en la variedad "Atoyac".

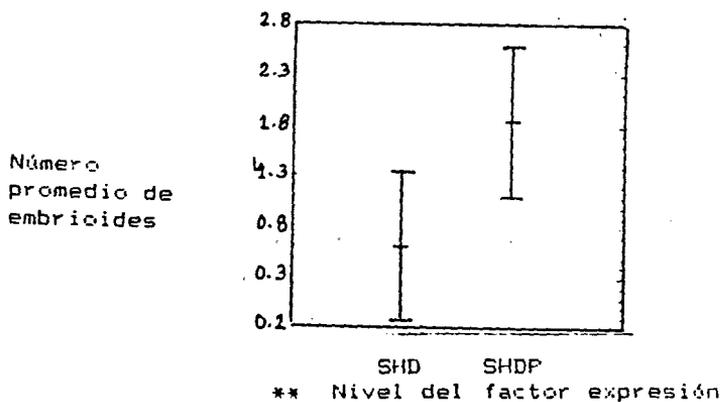


FIGURA A-2. Intervalos de diferencia mínima significativa para el factor expresión en la fase I en la variedad "Atoyac".

* Medio de cultivo SHB y SHC (ver Tabla 5.1)
 ** Medio de cultivo SHD y SHDP (Tabla 5.1)

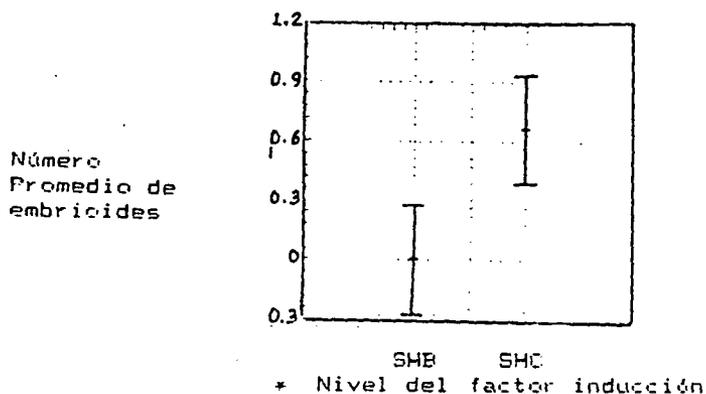


FIGURA A-3. Intervalos de diferencia mínima significativa para el factor inducción en la fase 2 en la variedad "Atoyac".

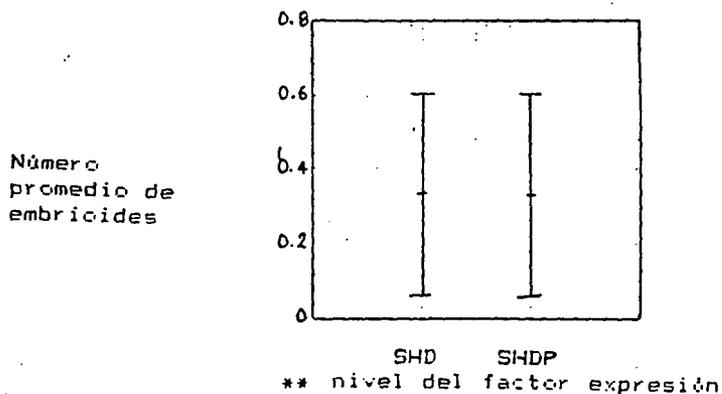


FIGURA A-4. Intervalos de diferencia mínima significativa para el factor expresión en la fase 2 en la variedad "Atoyac".

* Medio de cultivo SHB y SHC (ver Tabla 5.1)
 ** Medio de cultivo SHD y SHDP (Tabla 5.1)

TABLA A-2. Tabla de análisis de varianza de la respuesta embriogénica en la fase de expresión 2 en la variedad "Atoyac".

FUENTE DE VARIACION	S.S	g.l	MS	F	P(F)
INDUCCION	6.666	1	6.666	5.957	.017
EXPRESION	.000	1	.000	.000	1.000
INTERACCION	.000	1	.000	.000	1.000
INDUCC. EXPRES.	.000	1	.000	.000	1.000
ERROR	62.666	56	1.119		
TOTAL (CORR.)	69.333	59			

TABLA A-3. Tabla de análisis de varianza en la respuesta embriogénica en la fase de expresión 4 en la variedad "Atoyac".

FUENTE DE VARIACION	S.S	g.l	MS	F	P(F)
INDUCCION	.066	1	.066	.059	.811
EXPRESION	.266	1	.266	.236	.634
INTERACCION	5.400	1	5.400	4.785	.032
INDUCC. X EXPRES.	5.400	1	5.400	4.785	.032
ERROR	63.200	56	1.129		
TOTAL (CORR.)	68.933	59			

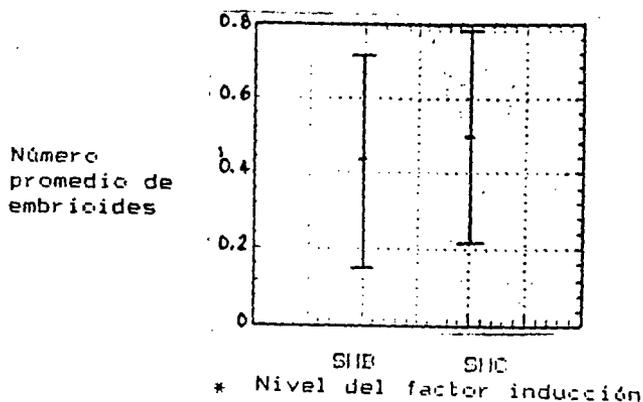


FIGURA A-5. Intervalos de diferencia mínima significativa para el factor inducción en la fase 2 en la variedad "Atoyac".

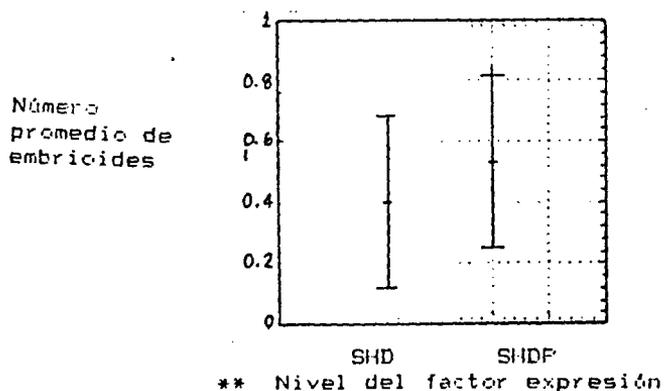


FIGURA A-6. Intervalos de diferencia significativa para el factor de expresión en la fase 4 en la variedad "Atoyac".

* Medio de cultivo SHB y SHC (ver Tabla 5.1)
 ** Medio de cultivo SHD y SHDP (Tabla 5.1)

TABLA A-4. Tabla de análisis de varianza de respuesta embriogénica en la fase de expresión 1 en la variedad "Mesilla".

FUENTE DE VARIACION	S.S	g.l	MS	F	P (F)
INDUCCION	35.266	1	35.266	6.215	.003
EXPRESION	9.699	1	9.699	2.660	.108
INTERACCION	15.000	1	15.000	4.156	.046
INDUCC. X EXPRES.	15.000	1	15.000	4.156	.046
ERROR	202.133	56	3.609		
TOTAL (CORR.)	262.000	59			

TABLA A-5. Tabla de análisis de varianza de respuesta embriogénica en la fase de expresión 2 en la variedad "Mesilla".

FUENTE DE VARIACION	S.S	g.l	MS	F	P (F)
INDUCCION	91.266	1	91.266	6.470	.013
EXPRESION	3.266	1	3.266	.232	.637
INTERACCION	3.266	1	3.266	.228	.639
INDUCC. X EXPRES.	3.266	1	3.266	.228	.639
ERROR	304.066	57	14.106		
TOTAL (CORR.)	398.600	59			

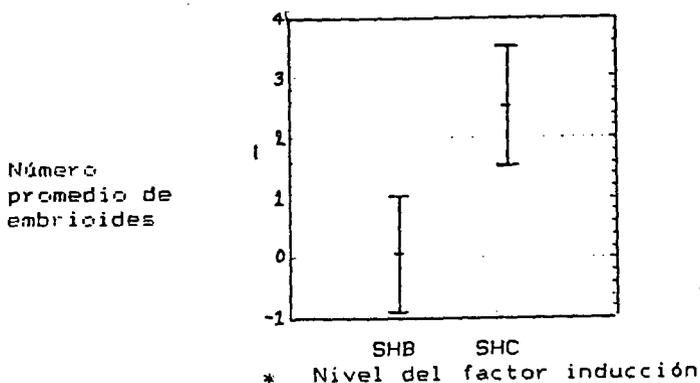


FIGURA A-7. Intervalos de diferencia mínima significativa para el factor de inducción en la fase I en la variedad "Mesilla".

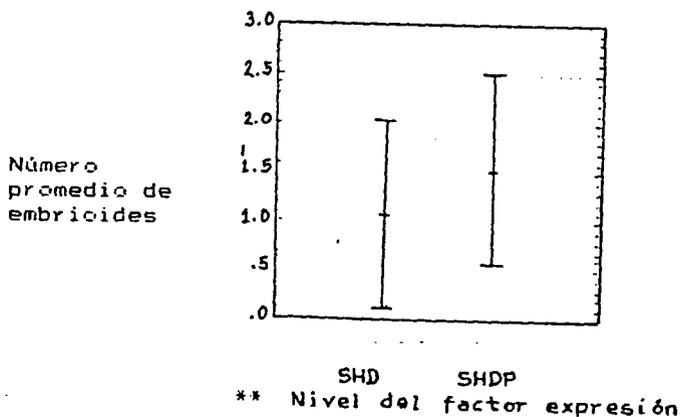


FIGURA A-8. Intervalos de diferencia mínima significativa para el factor expresión en la fase I en la variedad "Mesilla".

* Medio de cultivo SHB y SHC (ver Tabla 5.1)

** Medio de cultivo SHD y SHDP (Tabla 5.1)

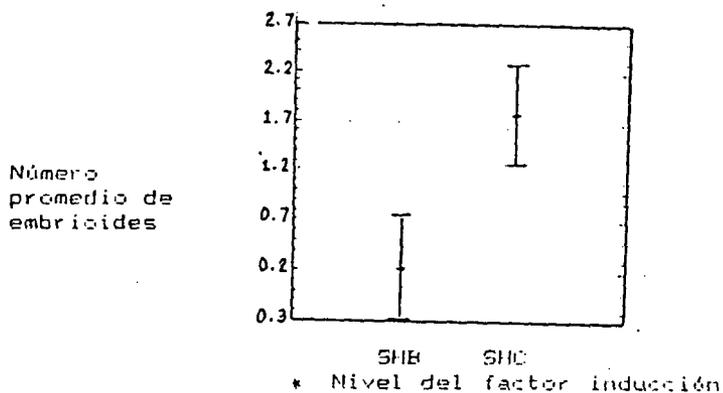


FIGURA A-9. Intervalos de diferencia mínima significativa para el factor inducción en la fase 2 en la variedad "Mesilla".

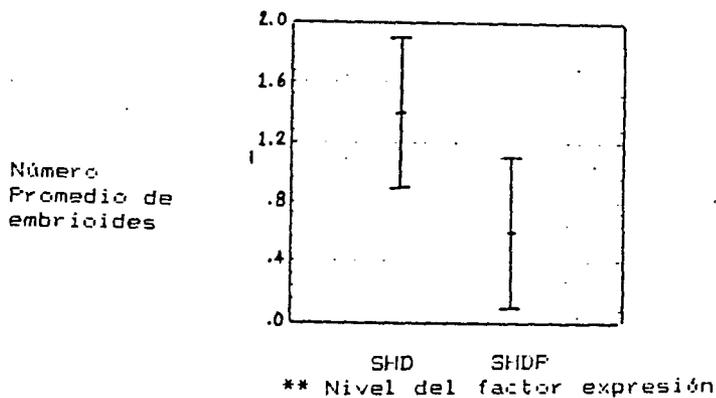


FIGURA A-10. Intervalos de diferencia mínima significativa para el factor expresión en la fase 2 en la variedad "Mesilla".

- * Medio de cultivo SHB y SHC (ver Tabla 5.1)
- ** Medio de cultivo SHD y SHDP (Tabla 5.1)

TABLA A-6. Tabla de análisis de varianza de respuesta embriogénica en la fase de expresión 4 en la variedad "Mesilla".

FUENTE DE VARIACION	S.S	g.l	MS	F	P (F)
INDUCCION	38.400	1	38.400	2.111	.151
EXPRESION	3.266	1	3.266	.180	.677
INTERACCION	4.266	1	4.266	.231	.637
INDUCC. X EXPRES.	4.266	1	4.266	.231	.637
ERROR	1032.400	56	18.435		
TOTAL (CORR.)	1078.667	59			

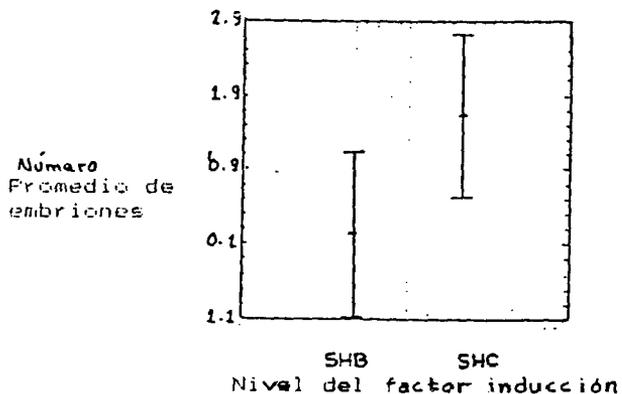


FIGURA A-11. Intervalos de diferencia mínima significativa para el factor de inducción en la fase de 2 en la variedad "Mesilla".

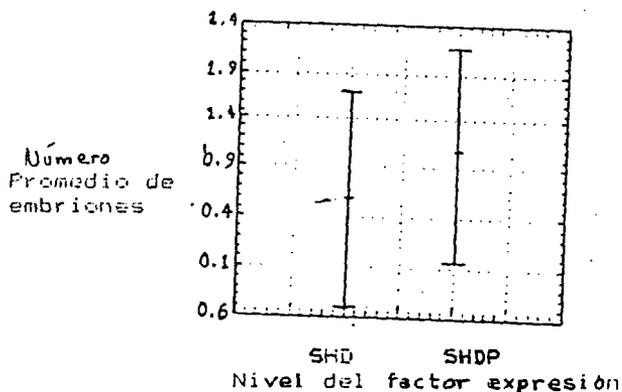


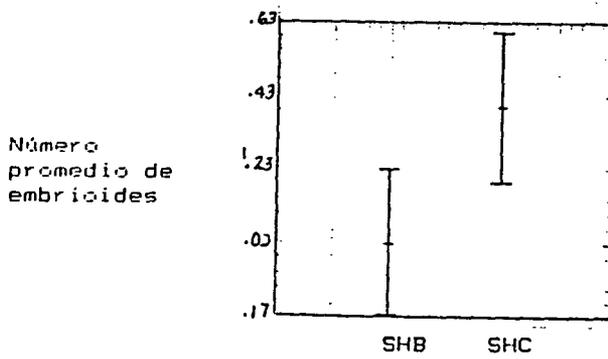
FIGURA A-12. Intervalos de diferencia mínima significativa para el factor expresión en la fase 4 en la variedad "Mesilla".

TABLA A-7. Tabla de análisis de varianza de la respuesta embriogénica en la fase de expresión 1 en la variedad "Florida".

FUENTE DE VARIACION	S.S	g.l.	MS	F	P(F)
INDUCCION	2.016	1	2.016	3.322	.073
EXPRESION	.150	1	.150	.247	.626
INTERACCION	.016	1	.016	.027	.870
INDUCC. X EXPRES.	.016	1	.016	.027	.870
ERROR	34.000	56	.607		
TOTAL (CORR.)	36.183	59			

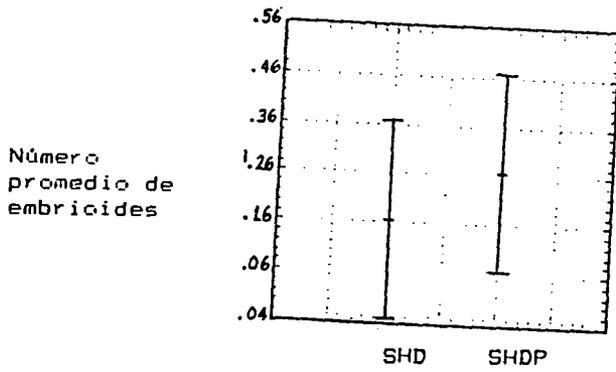
TABLA A-8. Tabla de análisis de varianza de la respuesta embriogénica en la fase de expresión 2 en la variedad "Florida".

FUENTE DE VARIACION	S.S	g.l	MS	F	P(F)
INDUCCION	68.266	1	68.266	8.871	.004
EXPRESION	4.266	1	4.266	.554	.467
INTERACCION	4.266	1	4.266	.554	.467
INDUCC. X EXPRES.	4.266	1	4.266	.554	.467
ERROR	430.933	56	7.695		
TOTAL (CORR.)	507.733	59			



* Nivel del factor inducción

FIGURA A-13. Intervalos de diferencia mínima significativa para el factor de inducción en la fase 1 en la variedad "Florida".



** Nivel del factor expresión

FIGURA A-14. Intervalos de diferencia mínima significativa para el factor expresión en la fase 1 en la variedad "Florida".

* Medio de cultivo SHB y SHC (ver Tabla S.1)
 ** Medio de cultivo SHD y SHDP (Tabla S.1)

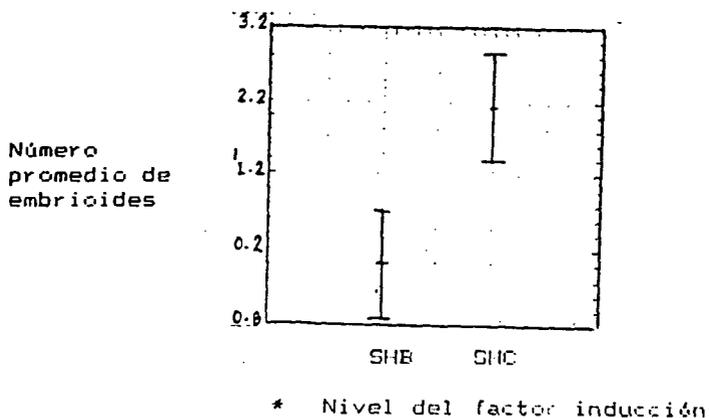


FIGURA A-15. Intervalos de diferencia mínima significativa para el factor inducción en la fase 2 en la variedad "Florida".

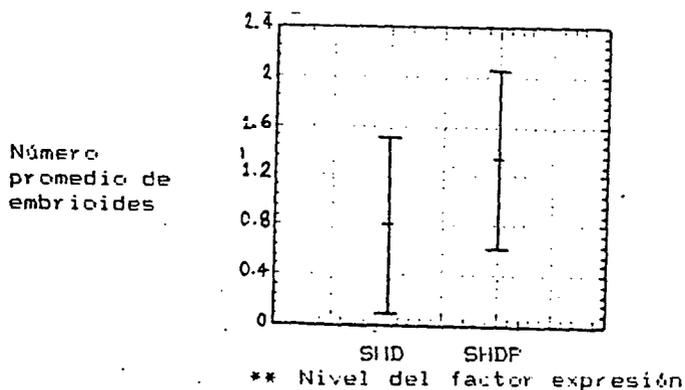


FIGURA A-16. Intervalos de diferencia mínima significativa para el factor de expresión en la fase 2 en la variedad "Florida".

* Medio de cultivo SHB y SHC (ver Tabla 5.1)
 ** Medio de cultivo SHD y SHDP (Tabla 5.1)

TABLA A-9. Tabla de análisis de varianza de la respuesta embriogénica en la fase de expresión 4 en la variedad "Florida".

FUENTE DE VARIACION	S.S	g.l	MS	F	P(F)
INDUCCION	13.066	1	13.066	3.698	.059
EXPRESION	1.666	1	1.666	.472	.502
INTERACCION	2.400	1	2.400	.679	.422
INDUCC. X EXPRES.	2.400	1	2.400	.679	.422
ERROR	197.966	56	3.533		
TOTAL (CORR.)	215.000	59			

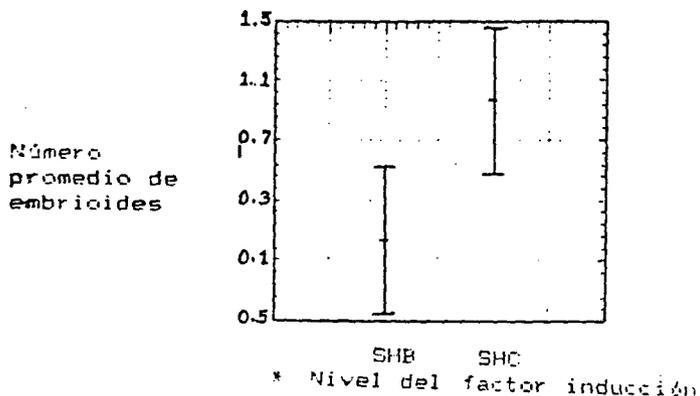


FIGURA A-17. Intervalos de diferencia mínima significativa para el factor inducción en la fase 2 en la variedad "Florida".

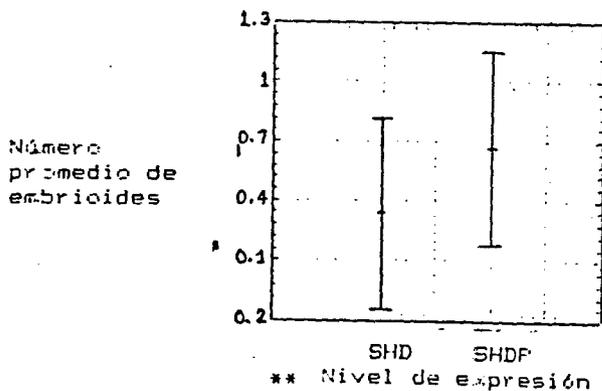


FIGURA A-18. Intervalos de diferencia mínima significativa para el factor de expresión en la fase 4 en la variedad "Florida".

- * Medio de cultivo SHB y SHC (ver Tabla 5.1)
- ** Medio de cultivo SHD y SHDP (Tabla 5.1)

TABLA A-10. Tabla de análisis de varianza de respuesta embriogénica en la fase de expresión 1 en la línea experimental "7-S-92".

FUENTE DE VARIACION	S.S	g.l	MS	F	P (F)
INDUCCION	86.400	1	86.400	7.274	.009
EXPRESION	123.266	1	123.266	10.377	.002
INTERACCION	123.266	1	123.266	10.377	.009
INDUCC. X EXPRES.	123.266	1	123.266	10.377	.009
ERROR	677.066	57	11.878		
TOTAL (CORR.)	886.733	59			

TABLA A-11. Tabla de análisis de varianza de respuesta embriogénica en la fase de expresión 2 en la línea experimental "7-S-92".

FUENTE DE VARIACION	S.S	g.l	MS	F	P (F)
INDUCCION	84.016	1	84.016	3.237	.077
EXPRESION	2.016	1	2.016	.078	.784
INTERACCION	30.816	1	30.816	1.187	.280
INDUCC. X EXPRES.	30.816	1	30.816	1.187	.280
ERROR	1453.333	56	25.952		
TOTAL (CORR.)	1570.183	59			

Número promedio de embricoides

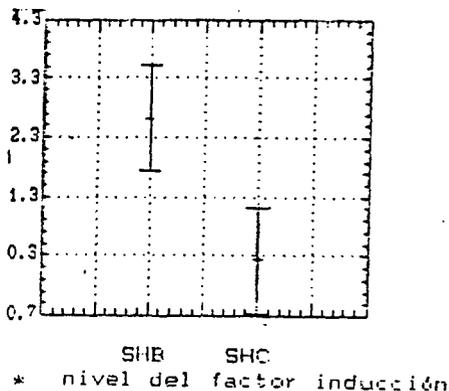


FIGURA A-19. Intervalos de diferencia mínima significativa para el factor inducción en la fase I en la línea experimental 7-S-92.

Número promedio de embricoides

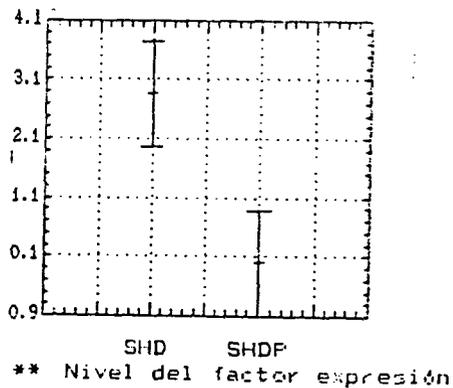


FIGURA A-20. Intervalos de diferencia mínima significativa para el factor expresión en la fase I en la línea experimental 7-S-92.

* Medio de cultivo SHB y SHC (ver Tabla 5.1)

** Medio de cultivo SHD y SHDP (Tabla 5.1)

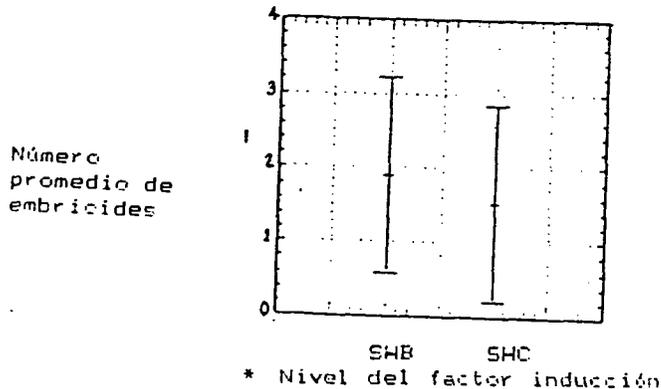


FIGURA A-21. Intervalos de diferencia mínima significativa para el factor de inducción en la fase 2 en la línea experimental '7-S-92'.

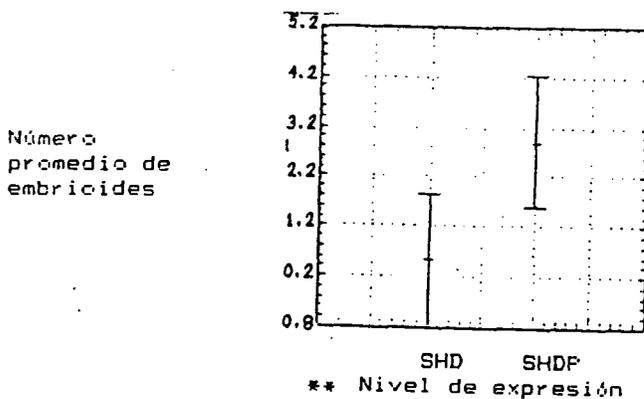


FIGURA A-22. Intervalos de diferencia mínima significativa para el factor expresión en la fase 2 en la línea experimental '7-S-92'.

* Medio de cultivo SHB y SHC (ver Tabla 5.1)
 ** Medio de cultivo SHD y SHDP (Tabla 5.1)

TABLA A-12. Tabla de análisis de varianza de respuesta embriogénica en la fase de expresión 4 en la línea experimental "7-S-92".

FUENTE DE VARIACION	S.S	g.l	MS	F	P (F)
INDUCCION	.150	1	.150	.059	.811
EXPRESION	2.016	1	2.016	.798	.3052
INTERACCION	8.816	1	8.816	3.487	.067
INDUCC. X EXPRES.	8.816	1	8.816	3.487	.067
ERROR	241.600	56	2.528		
TOTAL (CORR.)	152.583	59			

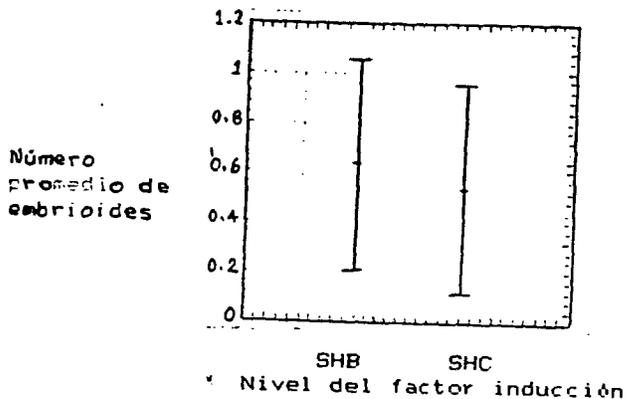


FIGURA A-23. Intervalos de diferencia mínima significativa para el factor inducción en la fase 2 en la línea experimental "7-S-92".

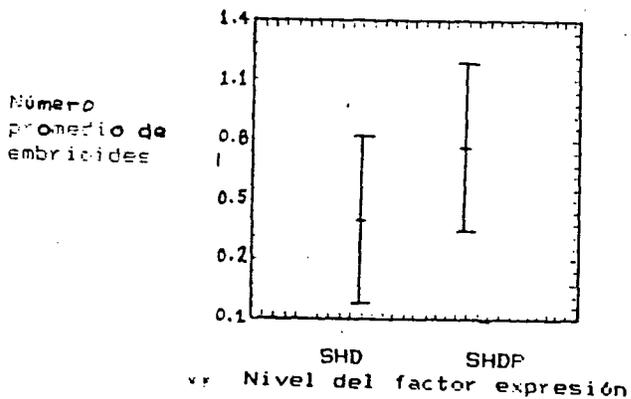


FIGURA A-24. Intervalos de diferencia significativa para el factor de expresión en la fase 4 en la línea experimental "7-S-92".

Medio de cultivo SHB y SHC (ver Tabla 5.1)

Medio de cultivo SHD y SHDP (Tabla 5.1)



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Expediente

Número 1076/89

SRITA. GLORIA FLORES ARAMBULA
P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "EFECTOS DE L-PROLINA, EN LA EMBRIOGENESIS SOMATICA DE -- CUATRO POBLACIONES DE ALFALFA (Medicago sativa L)" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos a usted que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis el Dr. Eulogio Pimienta Barrios.



ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Septiembre 12 de 1989
EL DIRECTOR

ING. ADOLFO ESPINOSA DE LOS MONTEROS CARDENAS

FACULTAD DE CIENCIAS

EL SECRETARIO

M. EN C. ROBERTO MIRANDA MEDRANO

c.c.p. El Dr. Eulogio Pimienta Barrios, Director de Tesis.-pte.
c.c.p. El expediente de la alumna.

M.C. Juan Luis Cifuentes Lemus
Director de la Facultad de Ciencias
Presente

Por medio de la presente le informo que la pasante en Biología Gloria Flores Arámbula, con No. de Reg. 080380739 a terminado satisfactoriamente el trabajo de tesis titulado EFECTO DEL AMINOACIDO L-PROLINA, EN LA EMBRIOGENESIS SOMATICA EN 3 VARIEDADES Y UNA LINEA EXPERIMENTAL DE ALFALFA (Medicago sativa, L). Estudio efectuado en el Centro de Investigacion y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Así mismo informo que he revisado el manuscrito de la tesis y considero que cumple con los requisitos establecidos por la Fac. de Ciencias a su digno cargo.

Sin mas por el momento aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E ,



DR. EULOGIO PIMIENTA B.

Director de Tesis

Guadalajara, Jal., 26 de Febrero de 1993.

C.c.p.- Interesado
c.c.p.- Archivo