

Encapsulación de embriones somáticos y cultivo en suspensión de células embriogénicas de alfalfa

GERÓNIMO PEÑA-CLÍMACO* y THELMA L. VILLEGAS-GARRIDO **

Departamento de Biofísica
Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN
Prol. de Carpio y Plan de Ayala, Col. Santo Tomás
Apartado Postal 42-186, 11340 México, D.F.

IGNACIO MAGAÑA-PLAZA

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería
Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN
Apartado Postal 14-740, 07000 México, D.F.

PEÑA-CLÍMACO, G.; I. MAGAÑA-PLAZA y T. L. VILLEGAS-GARRIDO, 1998. Encapsulación de embriones somáticos y cultivo en suspensión de células embriogénicas de alfalfa. *An. Esc. nac. Cienc. biol.*, Méx., **44**:155-171.

RESUMEN: En el presente estudio se inició el cultivo en suspensión de células embriogénicas de alfalfa (*Medicago sativa* L. y *Medicago falcata*), líneas A70.34 y F1.1 respectivamente, como parte de los estudios que se han realizado sobre los sistemas de embriogénesis somática que se tienen establecidos en el laboratorio. Se encontró que el cultivo en suspensión de callos, produjo un incremento de más del 200% en el rendimiento de embriones somáticos generados en sendas líneas de alfalfa, en comparación con el cultivo *in vitro* en medio semisólido. Adicionalmente se tiene la posibilidad de incrementar el rendimiento de embriones optimizando las condiciones de cultivo en suspensión. Por otro lado se desarrolló un procedimiento para producir una matriz de encapsulación para los embriones somáticos, utilizando diferentes polímeros de alginato de sodio y ácido poligalacturónico. Las cápsulas con mejores características para la encapsulación se obtuvieron con una concentración de 1.25% de alginato de sodio de viscosidad media (3,500 cps.) y 100 mM de CaCl₂, las cápsulas de pectinato se prepararon con una concentración de 7.5% de ácido poligalacturónico y 200 mM de CaCl₂. El proceso de encapsulación no limita la germinación de los embriones somáticos ni su posterior desarrollo, no habiendo diferencia significativa en los porcentajes de germinación de embriones encapsulados y no encapsulados. Es importante considerar que el desarrollo de sistemas de encapsulación para la producción de "semillas artificiales" requiere de procesos de embriogénesis bien establecidos que produzcan embriones de alta calidad.

INTRODUCCIÓN

Una de las áreas de mayor potencial dentro del cultivo de tejidos vegetales es la producción masiva de plantas que tengan un interés determinado, que puede ser económico, agrícola o cultural. Hasta la fecha los sistemas de propagación clonal *in vitro*

*Becario Conacyt.

**Becaria COFAA y EDD.

de plantas a nivel comercial, se basan en la propagación de estructuras diferenciadas (brotes, yemas, meristemos, etc.) y en ocasiones por organogénesis somática. Estos métodos requieren de un intenso trabajo manual y en muchos casos los niveles de producción son similares a los que se obtienen por la propagación vegetativa tradicional, con la desventaja de que la propagación de los cultivos *in vitro* sólo se justifica en especies de alto valor unitario.

La producción de plantas por embriogénesis somática es un hecho bien establecido en cientos de especies vegetales (Dos Santos, *et al.* 1983, Ammirato, 1987, Christiansen, 1987). Entre las ventajas que ofrece la producción de embriones somáticos están: la posibilidad de producir una gran cantidad de embriones, la característica de bipolaridad que distingue a los embriones como plantas individuales, la similitud en diferentes niveles de organización, es decir, morfológico, fisiológico y bioquímico con sus contrapartes sexuales, y su capacidad para producir una nueva planta completa por el proceso de conversión o germinación. Las características de los embriones somáticos son referencia del gran potencial biotecnológico para la producción masiva de plantas en laboratorio.

Lo anterior lleva a la posibilidad de producir "semillas artificiales" a través de diferentes procesos de liberación de embriones somáticos, entre los que se encuentran la encapsulación con diferentes polímeros, así como el secado de embriones somáticos.

Para llegar a la producción en gran escala de plantas se requiere superar varios retos, en primer lugar contar con un sistema de embriogénesis somática modelo, del cual se conozca el comportamiento del cultivo bajo diferentes condiciones y que al mismo tiempo se tengan altos niveles de producción, con embriones de alta calidad y con altos porcentajes de germinación (Parrot *et al.*, 1993). También se requiere conocer las variables moleculares que juegan un papel importante en el proceso, como es el caso de algunas proteínas de membrana que tienen efectos promotores o inhibidores en la embriogénesis somática (Toonen *et al.*, 1997 y Lind *et al.*, 1997).

Posteriormente se requiere el desarrollo de nuevos procesos, como el diseño de biorreactores específicos para la producción de embriones somáticos (McDonald y Jackman, 1989; Takayama y Akita, 1994). Así como el desarrollo de sistemas donde la generación de embriones se lleva a cabo por la vía directa (Kuklin *et al.*, 1994) previamente es necesario realizar estudios de cultivo en suspensión de células embriogénicas, como son los estudios reportados en el presente artículo.

Los objetivos de este trabajo fueron: 1) conocer el efecto que tiene el cambio de las condiciones de cultivo en medio semisólido a medio líquido en la inducción y desarrollo de embriones somáticos de alfalfa y 2) desarrollar una matriz de encapsulación con diferentes polímeros que pudieran contener a los embriones somáticos de manera individualizada y que al mismo tiempo no se limite su desarrollo y conversión a plántula, lo anterior permite también plantear las bases tanto para estudios de morfogénesis del proceso de embriogénesis somática en células vegetales, así como plantear directrices para el desarrollo de la tecnología de producción de "semillas artificiales".

Para producir una semilla artificial se debe desarrollar una matriz que sea capaz de contener al embrión somático, liberar e intercambiar con su medio nutrientes y otros elementos y compuestos necesarios para la conversión del embrión en planta. Idealmente la cápsula podría contener sustancias y microorganismos para variedades y condiciones ambientales específicas, de tal forma que el embrión somático encapsulado se pudiera manejar como se hace actualmente con los sistemas de producción de semilla de origen sexual.

Entre los polímeros utilizados para la encapsulación de embriones somáticos están los alginatos (Redenbaugh *et al.*, 1987), y un polímero, el ácido poligalacturónico (pectina), que no ha sido reportado para la encapsulación de embriones somáticos pero sí para microorganismos como bacterias (Magaña, 1987), estos polímeros fueron utilizados en el presente estudio. Con respecto al cultivo en suspensión de embriones somáticos, se utilizaron dos sistemas de embriogénesis somática en alfalfa.

MATERIAL y MÉTODOS

1. *Material vegetal*

En el presente estudio se trabajó con semillas de alfalfa (*Medicago sativa* L.) variedad Reagelander línea A70.34, proporcionadas por el Plant Research Center de Agricultura de Canadá y con plántulas de alfalfa (*Medicago falcata*) línea F1.1, provenientes del mismo centro de investigación.

2. *Cultivo in vitro*

Se utilizaron los medios de cultivo basales de Murashige y Skoog (1962), MS modificado (Meijer y Brown, 1987) y B5e (Villegas y Brown, 1987, modificado de Gamborg *et al.*, 1968). El pH de los medios se ajustó, previo a la esterilización, a 5.8 ± 0.1 con NaOH o HCl 0.1 N. La esterilización de los medios se realizó en autoclave a $15-17 \text{ lb/pulg}^2$ de presión y 121°C , por 20 minutos.

La obtención de material aséptico se realizó sembrando en frascos "gerber" semillas de alfalfa, previamente desinfectadas con etanol al 70% por un minuto e inmediatamente transferidas a hipoclorito de sodio comercial al 30% por cinco minutos. La incubación de los cultivos se realizó con una intensidad luminosa de $15 \pm 2 \text{ W/m}^2$ (aproximadamente 3,000 lux), en fotoperiodo 16/8 luz-oscuridad a una temperatura de $27 \pm 3^\circ\text{C}$.

3. *Embriogénesis somática*

El proceso de embriogénesis somática se realizó de acuerdo a Villegas (1991). Para alfalfa A70.34 la inducción de embriogénesis somática se llevó a cabo sembrando fragmentos de peciolos de 5-8 mm de longitud en medio B5e, suplementado con 1 mg/l de ácido 2,4 - diclorofenoxiacético (2,4-D), 0.2 mg/l de kinetina (Kn), 30 g/l de sacarosa, 1.25 g/l de cas-aminoácidos y 8 g/l de agar, dejando en incubación por 12-15 días. En el caso de *Medicago falcata* línea F1.1, la inducción se realizó en medio MS modificado por Brown y Atanassov (1985), con 5 mg/l de 2,4-D, 1 mg/l de Kn, 30 g/l de sacarosa y 8 g/l de agar, la incubación de los inóculos también fue por 12 días.

El cambio a medio de desarrollo para los embriones se realizó transfiriendo los callos de las líneas A70.34 y F1.1, después de 12 días en medio de inducción, a los mismos medios de cultivo pero sin reguladores del crecimiento, manteniendo la incubación por 28-30 días.

La germinación o conversión de los embriones somáticos se logró en medio MS basal al 50%, suplementado con 0.01 mg/l de GA_3 y 15 g/l de sacarosa, transfiriendo los embriones somáticos al concluir los 40-42 días del proceso de embriogénesis somática.

4. Cultivo en suspensión

Se evaluó el efecto del cultivo en suspensión en callos embriogénicos de alfalfa A70.34 y F1.1 durante 1, 3 y 5 días antes y después del momento de realizar la transferencia (día 12) de los callos, del medio de inducción al de desarrollo.

Se colocaron alrededor de 25 callos embriogénicos distribuidos en 4-5 matraces *Erlenmeyer* de 125 ml, aproximadamente 1 g de callo por matraz, con 25 ml del medio de cultivo respectivo (inducción o desarrollo).

La agitación se realizó en una agitadora de vaivén a 60-70 ciclos por minuto, las condiciones de iluminación y fotoperiodo durante el cultivo en suspensión fueron las ya descritas.

Después de transcurrido el tiempo en suspensión se realizó un filtrado con papel filtro, eliminando los agregados de mayor tamaño y se colocó en cajas petri de 100 x 15 mm con 30 ml del respectivo medio de desarrollo, se evaluó el rendimiento de embriones por inóculo sembrado al final del proceso de embriogénesis (día 40-42), el filtrado se resembró en frascos "gerber" con medio de desarrollo.

5. Desarrollo de la matriz de encapsulación

Se probaron tres polímeros de alginato de sodio de baja, media y alta viscosidad (250, 3,500 y 14,000 cps respectivamente) y ácido poligalacturónico de 98% de pureza (reactivos de *Sigma Chemical*) para producir esferas de gel con las características adecuadas para contener embriones somáticos tanto de alfalfa A70.34 como de F1.1. La formación de las cápsulas se llevó a cabo haciendo reaccionar cada polímero en solución con cloruro de calcio en diferentes concentraciones.

Cada tipo de alginato de sodio se preparó en concentraciones de 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0% en solución de NaCl al 0.85% (Mullon, 1987). Para el ácido poligalacturónico se preparó al 6.0, 7.0 y 8.0% ajustando el pH a 6.0 ± 0.1 con NH_4OH concentrado (Magaña, 1987). La concentración de CaCl_2 para la producción de las cápsulas fue en concentraciones de 12.5-200 mM y 50-400 mM para alginato y pectinato respectivamente.

La producción de cápsulas de gel se llevó a cabo goteando lentamente las soluciones de alginato y pectinato en cada solución de calcio utilizando un capilar de 3.5 mm de diámetro. La reacción de intercambio iónico entre gel y la sal de calcio es en corto tiempo, se obtienen cápsulas de gel insolubles en agua en 5-40 minutos, se evaluó peso, tamaño y forma de las cápsulas obtenidas.

6. Encapsulación de embriones somáticos

Se encapsularon embriones somáticos de alfalfa A70.34 y F1.1 en estado torpedo con un tamaño entre 2-4 mm de longitud. Los embriones de ambas especies se mezclaron por separado con el gel en cuestión (alginato al 1.25% o pectinato al 7.5%), entonces se succionaron los embriones en condiciones de asepsia con un capilar de 3.5 mm de diámetro, posteriormente se gotearon los embriones, un embrión por gota, en solución de calcio, 100 y 200 mM para cápsulas de alginato y pectinato, respectivamente.

Las cápsulas formadas, con un embrión en cada una de ellas, se dejaron en solución de calcio por 20-35 minutos y se lavaron 3 veces con agua esterilizada para eliminar el exceso de la sal.

Los embriones encapsulados fueron puestos en medio de germinación y de ahí a las condiciones de incubación descritas.

Como control para evaluar el efecto de la encapsulación, se sembraron embriones sin encapsular en medio de germinación. Se evaluaron los porcentajes de germinación de embriones encapsulados y no encapsulados.

RESULTADOS

Cultivo in vitro

Al inicio del trabajo se obtuvo una respuesta de embriogénesis somática en alfalfa A70.34 de alrededor del 15%, utilizando como inóculo a peciolo de plántulas provenientes de semilla, con un rendimiento promedio de cinco embriones por inóculo en medio de cultivo semisólido.

Con la selección recurrente se logró obtener plantas embriogénicas con respuestas de hasta 90-95% en alfalfa A70.34.

En el caso de alfalfa F1.1, no fue necesaria la selección recurrente, la respuesta fue comúnmente mayor al 90%.

Con respecto al rendimiento, la variación de las condiciones de cultivo, la separación de las fases de inducción y desarrollo, la inclusión de cas-aminoácidos en los medios de inducción y desarrollo, etc., propiciaron incrementos en el rendimiento de los embriones, incluso se observaron mejoras en la morfología y vigor de los embriones, lo que se tradujo en un incremento de los porcentajes de germinación o conversión.

Después de las diferentes manipulaciones de los medios de cultivo, se alcanzaron rendimientos promedio de 15 embriones somáticos por inóculo en medio semisólido, en ambas líneas de alfalfa.

Cultivo en suspensión

Con el cultivo en medio en suspensión, cuya instalación experimental se muestra en la figura 1, se incrementó el rendimiento de embriones somáticos tanto en la fase de inducción como en la de desarrollo.

En la gráfica 1 se reportan los resultados del promedio de rendimiento, con sus correspondientes desviaciones estándar, de embriones somáticos que se formaron en dos series de experimentos con dos repeticiones cada una. Se observa en la gráfica que los cultivos en suspensión de callos embriogénicos de alfalfa F1.1 triplican el rendimiento en comparación con su cultivo en medio semisólido, el efecto durante el proceso de desarrollo fue menor. En la misma gráfica se observa que el rendimiento varió entre 19 y 49 embriones por inóculo, producción mayor que la obtenida en medio semisólido.

En el caso de alfalfa A70.34, en la gráfica 1 se observa que el cultivo en suspensión de callos embriogénicos, en la fase de inducción, produce un incremento en el rendimiento de 13 a 42 embriones por inóculo. Con respecto al proceso de desarrollo el incremento es mayor alcanzándose un rendimiento de hasta 53 embriones por inóculo.

Desarrollo de la matriz de encapsulación

La instalación experimental utilizada para obtener embriones somáticos encapsulados en todos los experimentos realizados, se encuentra representada en el esquema mostrado en la figura 2.

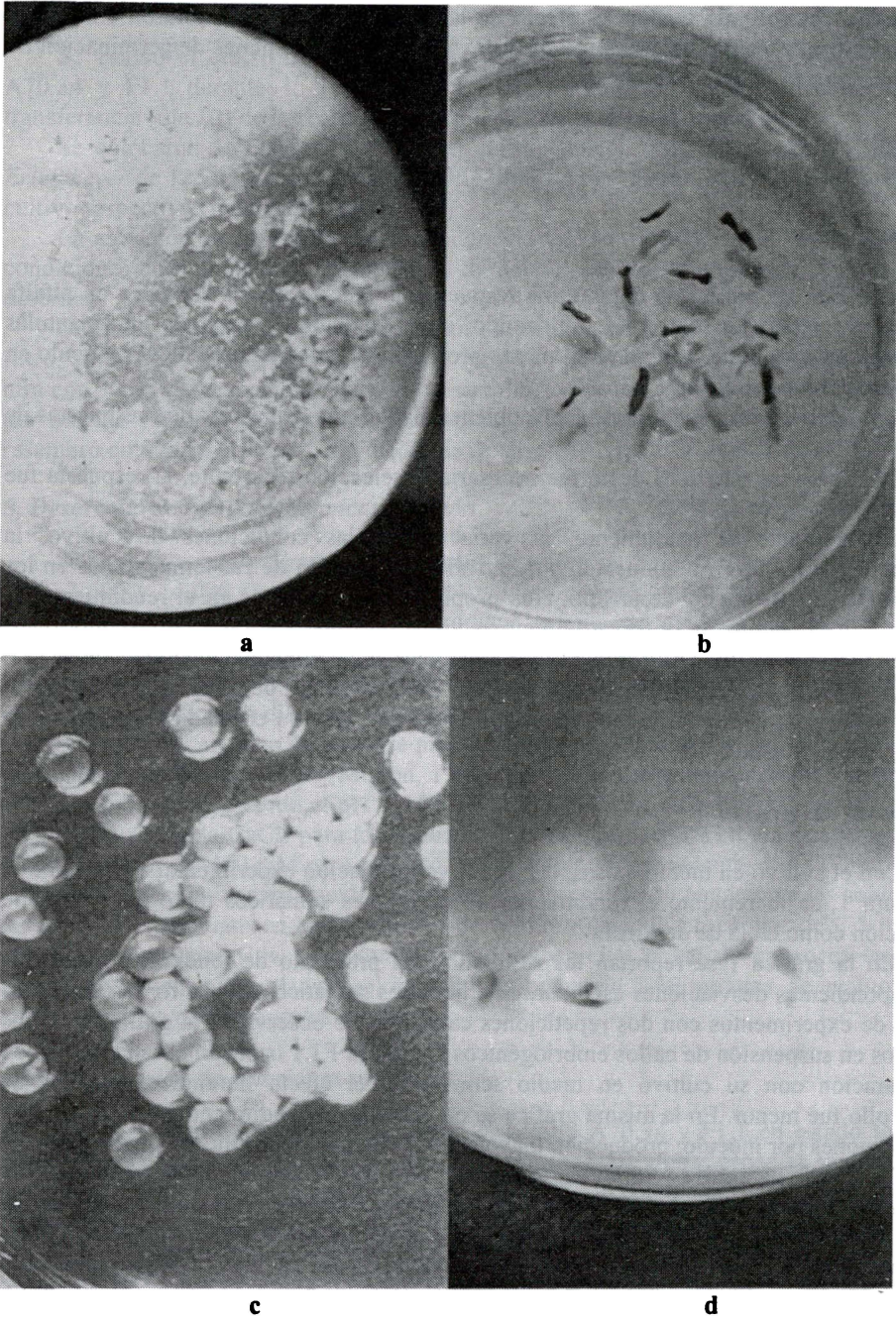
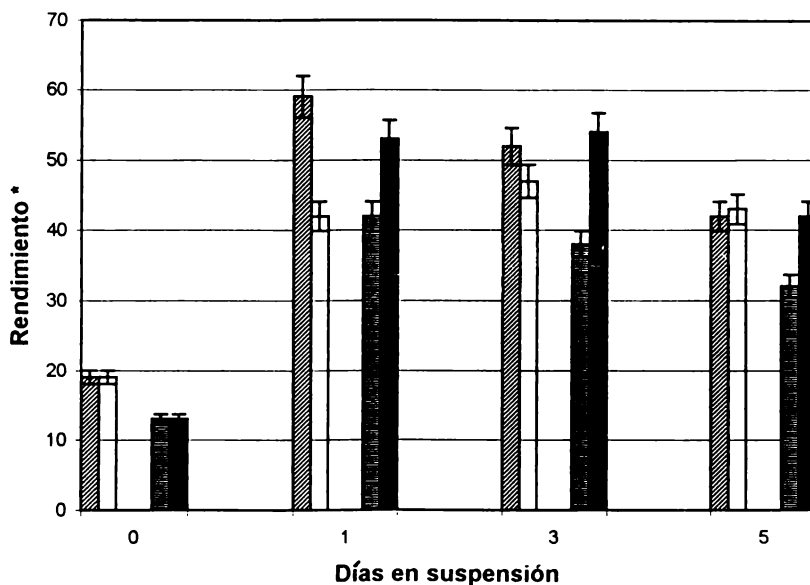


FIG. 1. Cultivo en suspensión de alfalfa y encapsulación de embriones somáticos: **a.** Matraz de 125 ml con embriones somáticos y callo de alfalfa, **b.** Embriones somáticos en estado torpedo, antes de encapsular, **c.** Embriones somáticos de alfalfa encapsulados y **d.** Conversión o germinación de embriones somáticos encapsulados.

GRÁFICA 1. Efecto del cultivo en suspensión sobre el rendimiento de embriones somáticos en alfalfa.



* Promedio del número de embriones generados por callo



DURANTE LA FASE DE INDUCCION EN LA LÍNEA F1.1



DURANTE LA FASE DE DESARROLLO EN LA LÍNEA F1.1



DURANTE LA FASE DE INDUCCION EN LA LÍNEA A70.34



DURANTE LA FASE DE DESARROLLO EN LA LÍNEA A70.34

En la gráfica 2, se observan los resultados de producción de cápsulas de gel con alginato de viscosidad baja (250 cps), donde las barras representan el diámetro promedio de aquellas cápsulas bien formadas, con forma esférica y consistencia adecuada. Con una concentración de alginato de sodio de 0.5% no fue posible obtener cápsulas a ninguna concentración de CaCl_2 , de igual forma con la concentración de 12.5 mM de CaCl_2 tampoco fue posible obtener cápsulas a ninguna concentración probada. Para las restantes concentraciones de sal y alginato, se obtuvieron esferas deformes o de consistencia poco adecuada.

En alginato de viscosidad media (3,500 cps), hubo buena formación de cápsulas a concentraciones de 1.0 y 1.5% de gel, la concentración mínima de CaCl_2 para formar cápsulas en forma de esfera fue de 25 mM, con concentraciones de 50 y 100 mM la consistencia de las cápsulas es mas rígida. En la gráfica 3 se aprecia que a medida que

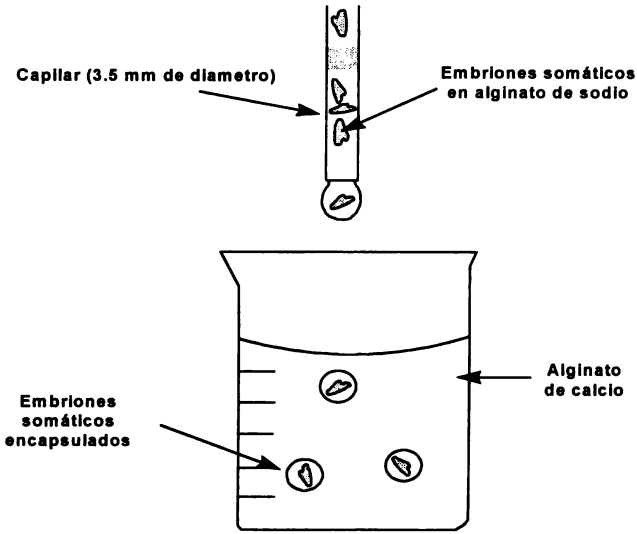
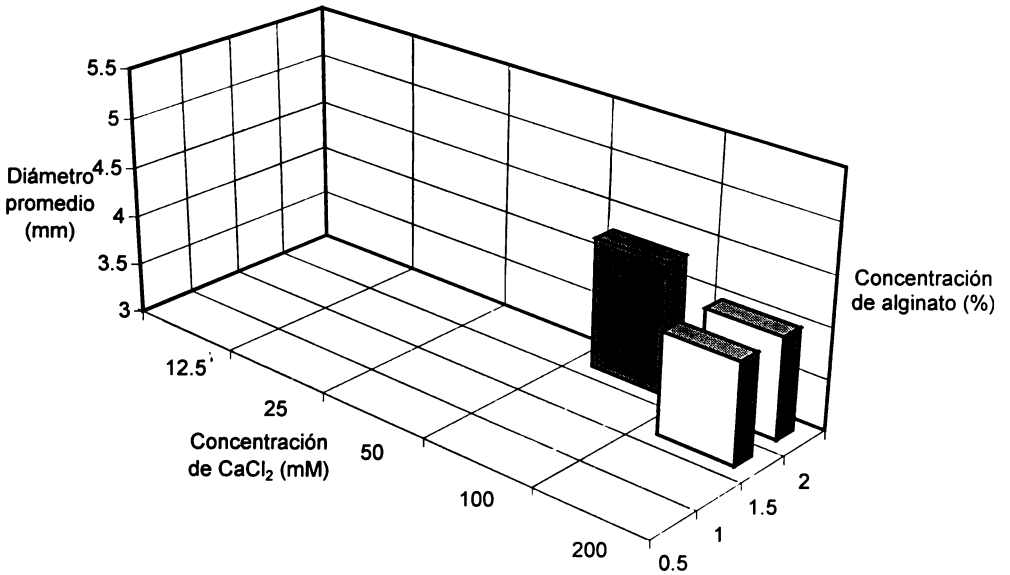
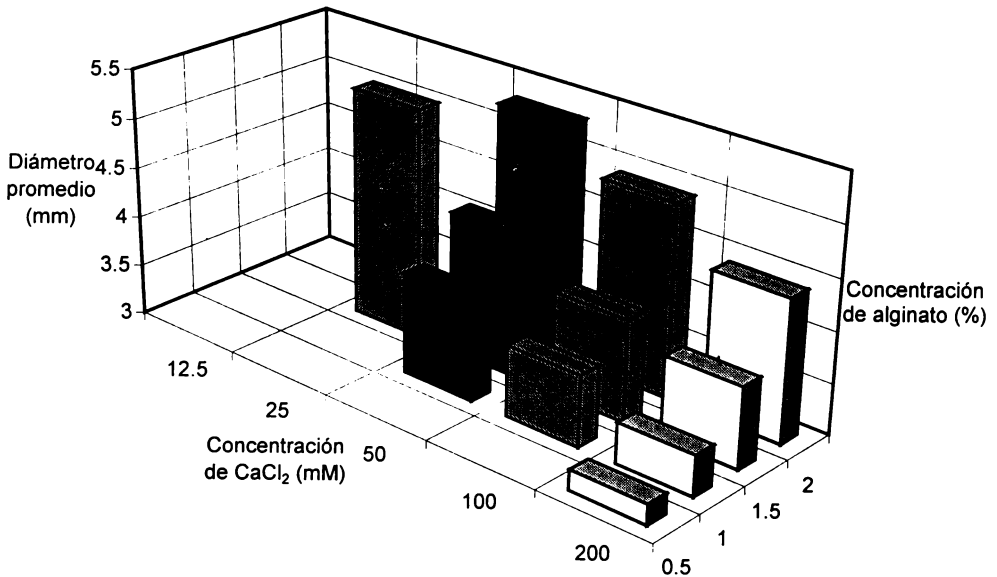


FIG. 2. Esquema de encapsulación de embriones.

GRÁFICA 2. Producción de cápsulas de alginato de calcio a partir de alginato de sodio de viscosidad baja (250 cps).



GRÁFICA 3. Producción de cápsulas de alginato de calcio a partir de alginato de sodio de viscosidad media (3,500 cps).



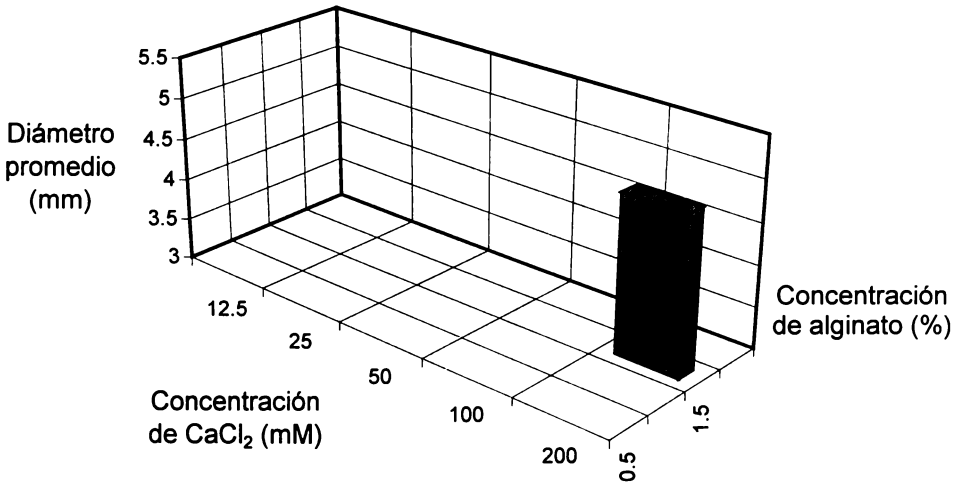
aumenta la concentración de alginato aumenta el tamaño y peso de las esferas obtenidas; de igual forma, a medida que aumenta la concentración de CaCl_2 disminuye el tamaño y peso de las esferas. Las concentraciones donde se formaron las cápsulas con mejor forma y tamaño para contener embriones somáticos fue con alginato de sodio de viscosidad media a 1.0-1.5% y CaCl_2 50-200 mM.

En alginato de sodio de alta viscosidad (14,000 cps), el intervalo de concentraciones de alginato para formar cápsulas es más estrecho (gráfica 4). A una concentración de 0.5% de alginato de sodio no se produjeron esferas en ninguna concentración de CaCl_2 , con 2.0% de alginato, la excesiva viscosidad del gel impidió la formación de cápsulas con el procedimiento descrito, a concentraciones de 1.0 y 1.5% de alginato, el tamaño y peso de las cápsulas siguió el comportamiento observado en las cápsulas de alginato de viscosidad media, es decir disminución del tamaño y peso de las cápsulas al aumentar la concentración de agente que induce la formación del complejo de asociación.

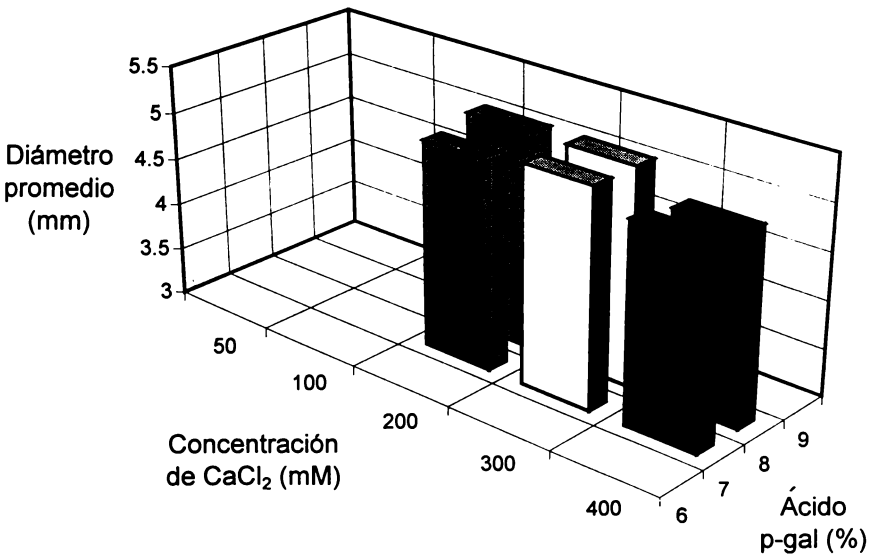
Con el alginato de alta viscosidad se obtuvieron las cápsulas de mayor peso y tamaño, sin embargo la consistencia, determinada manualmente, fue la menos rígida en los tres tipos de alginato probados, lo que dificultaría el manejo de los embriones encapsulados por la fragilidad de las cápsulas.

En la gráfica 5 se presentan los resultados de producción de cápsulas de pectinato, en este caso y de la misma manera a como se trataron los experimentos de encapsulación en geles de alginato, las barras representan el diámetro promedio de las cápsulas esféricas bien formadas y de consistencia adecuada con embriones encapsulados en geles de pectinato. En este caso no se aprecia ninguna tendencia con respecto al aumento del tamaño de las cápsulas en las diferentes concentraciones de pectinato y CaCl_2 utilizadas; no obstante, sí fue posible obtener cápsulas de pectinato con las

GRÁFICA 4. Producción de cápsulas de alginato de calcio a partir de alginato de sodio de viscosidad alta (14,000 cps).



GRÁFICA 5. Producción de cápsulas de pectinato de calcio, a partir de ácido poligalacturónico (p-gal).



En la gráfica 6 se muestran los resultados de los promedios, con sus correspondientes desviaciones estándar, del porcentaje de germinación de embriones somáticos encapsulados en los dos geles (alginato y pectinato) y del control, con embriones somáticos no encapsulados, de alfalfa A70.34 y F1.1, en experimentos con tres repeticiones individuales.

Como se observa, los porcentajes de germinación son muy similares, particularmente en alfalfa F1.1, en donde la diferencia entre la germinación de embriones encapsulados y no encapsulados es sólo de 4.0% en pectinato y de 10% en alginato. En el caso de alfalfa A70.34 los porcentajes de germinación de embriones encapsulados fueron siempre mayores al 65% y la diferencia con la germinación de embriones no encapsulados no fue mayor al 15%, estos resultados mostraron consistencia en posteriores experimentos de la misma forma que el sistema de embriogénesis somática de apio.

DISCUSIÓN

Los sistemas de embriogénesis somática de alfalfa presentaron diferentes características importantes de mencionar.

La respuesta inicial de embriogénesis de plántulas provenientes de semillas de alfalfa A70.34 fue muy variable; para superar este problema, y como se hace en la mayoría de los reportes de embriogénesis somática, se utilizó la selección recurrente, que consiste en identificar a las plántulas embriogénicas, regenerarlas por embriogénesis somática o propagación vegetativa por yemas y entrenudos y utilizar el material seleccionado para la posterior inducción de callos embriogénicos, así se incrementan los porcentajes de respuesta (Reisch y Bingham, 1980; Mitten *et al.*, 1984; Meijer y Brown, 1987).

En alfalfa F1.1 la respuesta en embriogénesis fue comúnmente mayor al 90%. Como ha sido reportado por Mitten *et al.* (1984) y por Brown y Atanassov (1985), las variedades o líneas con mayor contribución genética de *Medicago falcata* presentan una mayor respuesta en embriogénesis que las que provienen de *Medicago sativa*, por lo que en alfalfa F1.1 no fue necesaria la selección recurrente para obtener altas respuestas embriogénicas ya que la línea posee una alta contribución de *Medicago falcata*. Por otro lado, no hay que olvidar la variabilidad intrínseca en los procesos de propagación clonal, lo que también contribuye a mantener líneas estables y de alta productividad (Caligari y Shohet, 1993).

Cultivo en suspensión

En general se observó que los mayores rendimientos se obtuvieron cuando el tiempo de cultivo en suspensión no excedía los tres días, lo que permite inferir, en primera instancia, que el papel principal del cultivo en medio líquido es disgregar los callos y así permitir que un mayor número de proembriones y centros embrionarios tengan un mejor desarrollo, en segundo término, la disponibilidad de nutrientes y de otros componentes del medio es más homogénea y directa y, finalmente, al estar más separados los centros embriogénicos se disminuye la competencia entre sí, en medio semisólido la competencia entre los embriones no se puede evitar por su cercanía entre sí en un mismo callo.

Se observó que el filtrado del cultivo en suspensión presentaba una mayor cantidad de células y proembriones que continuaban su desarrollo con mayor producción de callo

o la producción de embriones somáticos, lo que indica claramente que el potencial de producción de embriones somáticos puede ser mucho mayor, en este punto es importante determinar hasta qué grado las células en cultivo en suspensión que provienen de callos embriogénicos son capaces de producir continuamente embriones por resiembras, filtrado y siembras consecutivas.

El hecho de que los rendimientos de embriones en cultivo en suspensión y la viabilidad de las células disminuyera cuando el tiempo en suspensión se prolongaba por más de cinco días, indica que para conservar la viabilidad, reproducción y rediferenciación de células embriogénicas en medio líquido, es necesario implementar mecanismos de control de las condiciones físicoquímicas, de transferencia de masa y energía, pH, temperatura y en general del ambiente del cultivo.

Lo anterior plantea el reto de diseñar sistemas en biorreactor que considere las características propias de las células embriogénicas y de los embriones somáticos en sus diferentes etapas de desarrollo.

Desarrollo de la matriz de encapsulación

La obtención de cápsulas adecuadas para contener embriones somáticos con alginato de baja viscosidad, sólo se da a altas concentraciones del polímero de CaCl_2 ; en concentraciones intermedias de ambos componentes de la reacción se obtienen cápsulas amorfas, y el tiempo de formación del complejo de asociación fue de 30 a 40 minutos.

El tamaño de las cápsulas puede variarse también de acuerdo al diámetro del instrumento de goteo. Por otro lado, es posible mecanizar la producción de cápsulas utilizando una bomba de aire y un atomizador. Rehg *et al.* (1986) reportan la producción de esferas de alginato de 1.2 y 2.3 mm de diámetro, con una desviación estándar del 10%.

Un punto importante que enfatizar es el proceso de gelificación; con el uso de CaCl_2 a menos de 50 mM la formación de esferas es más lenta, en cambio, a 200 mM la gelificación es más rápida. Rochefort *et al.* (1986), explican el fenómeno analizando la técnica de formación de cápsulas. Cuando se utiliza una concentración relativamente alta de agente inductor del complejo de asociación para la reacción con el alginato, la formación del gel es muy rápida en la superficie de la esfera, pues se ocupan sitios de intercambio catiónico y se desarrollan resistencias a la difusión para la reacción al interior de la cápsula, incluso si se suspende la reacción la esfera queda hueca.

Cuando se utiliza CaCl_2 en concentraciones de 50-100 mM, la gelificación es más lenta, así, el agente inductor del complejo puede penetrar más allá de la superficie y los sitios de intercambio catiónico se distribuyen más homogéneamente.

El mecanismo de gelación, se piensa, es simultáneamente intra e intermolecular (Morris *et al.*, 1982) con enlaces covalentes y covalentes coordinados entre el calcio y los polímeros de ácido manurónico y ácido glucurónico que componen al alginato.

Debido a la gran variedad de alginatos en el mercado, las concentraciones reportadas para procesos de encapsulación varían ampliamente dependiendo de la marca, pureza, tipo de alginato y el objetivo de la encapsulación. En el caso de organismos vivos, se puede encapsular desde células vegetales y animales hasta organismos completos, en nuestro caso embriones somáticos de plantas.

De acuerdo a los resultados obtenidos para la formación de cápsulas en los tres tipos de alginato utilizados, se decidió emplear, para el proceso de encapsulación de embriones somáticos, al alginato de sodio de viscosidad media a una concentración de 1.25% y como agente inductor del complejo, a CaCl_2 100 mM, y para las cápsulas de pectinato al ácido poligalacturónico al 7.5% y CaCl_2 200 mM.

Encapsulación de embriones somáticos y su posterior germinación

Redenbaugh *et al.* (1986) reportan el porcentaje de conversión de embriones somáticos de alfalfa y apio encapsulados en alginato y obtienen un 29 y 55% de germinación respectivamente, mencionan que no hubo diferencia significativa con los embriones somáticos no encapsulados (alfalfa 32% y apio 61%), en su caso utilizan alginato BDH al 3.2% y CaCl_2 50 mM, en otro reporte (Redenbaugh *et al.*, 1987); utilizan alginato Sigma al 2.0% y 0 CaCl_2 100 mM; el porcentaje de germinación que obtienen es entonces de casi el 50%.

Los estudios de encapsulación con hidrogeles como el alginato han sido los pioneros para el desarrollo de la tecnología de "semillas artificiales", la información que se ha generado sienta las bases para buscar nuevas alternativas que hagan más cercano el concepto de "semilla somática" (Redenbaugh *et al.*, 1993).

Por su parte, en un estudio de encapsulación de embriones somáticos de pino, Gupta y Durzan (1987), utilizan alginato al 1.0% y CaCl_2 100 mM, sin embargo el porcentaje de conversión que obtienen es del 0.0%, lo anterior pone en evidencia la necesidad de contar con sistemas de embriogénesis somática reproducibles con altos rendimientos y sobre todo con embriones de alta calidad que aseguren altos porcentajes de conversión a plántulas y resistencia a procesos como la encapsulación.

Los estudios de la presente investigación muestran que la conversión a plántula de embriones encapsulados o no, está directamente relacionada con la calidad del embrión. Los embriones de morfología normal y con mayor vigor no tuvieron problema para romper la cápsula de gel y continuar su desarrollo hasta plántula, se observó que en los experimentos en donde se incluyó medio de cultivo a la cápsula, el embrión somático la degrada y facilita su conversión, en cambio embriones anormales, muy pequeños o de bajo vigor tienen mayores problemas para romper la cápsula y continuar su desarrollo a plántula, incluso algunos de éstos mueren dentro de la cápsula.

Fujii *et al.* (1987) indican que uno de los principales factores que limitan el desarrollo de las semillas artificiales es probablemente la disponibilidad de nutrientes; para superar este problema los embriones deben de poseer su propia fuente de nutrientes (alto contenido de proteínas y carbohidratos de reserva) o proporcionárselos de manera exógena con el desarrollo de un "endospermo artificial".

En la actualidad no existen reportes con sistemas de embriogénesis somática bien desarrollados y cien por ciento reproducibles que incluyan el escalamiento en la producción de embriones somáticos de alta calidad con el uso de biorreactores. Cada sistema de embriogénesis en cada especie tiene sus propias características y condiciones de desarrollo, aun especies modelo (zanahoria, apio y alfalfa), que han sido estudiadas en múltiples aspectos.

Existen reportes en donde se pretende alcanzar el escalamiento en la producción de embriones somáticos con el uso de biorreactores (McDonald y Jakcman, 1989), no obstante, falta conocer muchos aspectos de los procesos que regulan la diferenciación y rediferenciación de las células vegetales para lograr la producción masiva de plantas por embriogénesis somática.

Paralelamente, para la producción de semillas artificiales se deben desarrollar sistemas más eficientes de encapsulación. Otra alternativa diferente que también puede ser complementaria a la encapsulación son los estudios de secado de los embriones somáticos, este último proceso es para tratar de hacer todavía más semejante la fisiología y bioquímica de los embriones somáticos con los sexuales. Es un campo de estudio fascinante que requiere de gran dedicación, tiempo y esfuerzo.

CONCLUSIONES

Los sistemas de embriogénesis somática de alfalfa A70.34 y F1.1 se encuentran bien establecidos en cuanto el proceso de obtención de embriones somáticos, desde la inducción hasta la conversión de la plántula. En cada sistema cada etapa es susceptible optimizar, no obstante, existe un límite en el rendimiento de embriones somáticos cuando el cultivo es en medio semisólido, en donde la competencia intrínseca por espacio y nutrientes hace que los rendimientos no sean tan altos.

Con el cultivo en suspensión en matraces *Erlenmeyer* se demostró que se pueden incrementar los rendimientos en la producción de embriones somáticos en más del 200%, sin considerar que no se reporta la optimización de condiciones, trabajo que será reportado en breve.

La disminución en el rendimiento de embriones somáticos a medida que se incrementa el tiempo de cultivo en suspensión, muestra claramente que es necesario tener un mayor control de los parámetros fisicoquímicos y en general de las condiciones de cultivo en medio líquido para mantener la viabilidad, reproducción y continua rediferenciación de células vegetales a embriones somáticos y así lograr mayores rendimientos.

De lograrse lo anterior el potencial de producción de plantas es impresionante ya que en un solo gramo de callo existen miles y miles de células y potencialmente miles y miles de embriones somáticos que pueden dar origen cada uno a una planta completa, por ello la importancia de los estudios a nivel de matraz en cultivo en suspensión, porque son la base para futuros estudios en biorreactor.

De los resultados de encapsulación de embriones somáticos se puede concluir que las cubiertas de protección con alginato y pectinato no limitan el desarrollo de los embriones somáticos, si éstos son de alta calidad y se determinan las mejores condiciones de conversión.

Los estudios de producción masiva de embriones somáticos en suspensión, incluso en biorreactor y el desarrollo de la tecnología de encapsulación u otro proceso como el secado de embriones somáticos son convergentes, y ambos aspectos bien establecidos proporcionarán una base firme para la tecnología de producción de "semillas artificiales".

Para el desarrollo de la tecnología de producción de "semillas artificiales" se deben considerar a los sistemas de manera integral, considerando desde los aspectos más simples del cultivo *in vitro* hasta la parte de ingeniería bioquímica, sin olvidar en ningún momento los costos de producción, que en gran parte limitarían la introducción de esta nueva tecnología.

SUMMARY

During this work, a suspension culture phase was developed in the embryogenic cultures of Alfalfa (*Medicago sativa* L.), using two embryogenic canadian lines: A70.34 and F1.1. as a part of the development of high-yield embryogenic systems to be established in our laboratory. It was found that the suspension cultures derived from embryogenic calli, induced a 20% increase in the yield of somatic embryos production, in contrast with the amount of embryos produced in semisolid media. In addition, it was confirmed the alternative of to increase even more the yields by the optimization of the suspension culture conditions. In this work as well, it was developed a laboratory procedure in order to achieve the encapsulation of the somatic embryos, by the use of alginate and polygalacturonic acid polymers, as encapsulation matrix. The embryo caps

which showed the best characteristics during the encapsulation experiments where those generated at a concentration of 1.25% of sodium alginate, with intermediate viscosity (3500 cps.) and those produced with polygalacturonic acid at a concentration of 7.5% and 200 mM of CaCl₂. It was found that the encapsulation of the somatic embryos does not limit their germination to plants, neither their normal growth. There was not a significant difference between the germination of the encapsulated and the no-encapsulated embryos as well. As a conclusion, it is very important to take into consideration that the development of an encapsulation system for the development of artificial seeds, requires of an embryogenic culture procedure well settled in order to produce high quality with high yield embryos.

BIBLIOGRAFÍA

- AMMIRATO, P.V., 1983. Embryogenesis. In: *Handbook of plant cell culture*. V. I. Evans, D.A., Sharp, W.R., Ammirato, P.V and Yamada, Y. (eds.). Nueva York. MacMillan Publishing Co., pp. 82-123.
- BROWN, D. C. W. and A. ATANASSOV, 1985. Role of genetic background in somatic embryogenesis in *Medicago*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 4:111-122.
- CALIGARI, P. S. D. and S. SHOHET, 1993. Variability in somatic embryos. In: *Synseeds: Applications of synthetic seeds to crop improvement*. Redenbaugh, K (ed.). CRC Press, pp. 163-181.
- CHRISTIANSEN, M. L., 1987. Causal events in morphogenesis. In: *Plant tissue and cell culture*. V. 3. C.E. Green, D. A. Sommers, W. P. Hackett and D. D. Biesboer, (eds.) Alan R. Liss Inc. Nueva York, pp. 45-55.
- DOS SANTOS, A. V. P., G. C. CUTTER and M. R. DAVEY, 1983. Origin and development of somatic embryos in *Medicago sativa* L. (alfalfa). *Protoplasma*, 117:107-115.
- FUJII, J. A., D. T. SLADE, K. REDENBAUGH, and K.A. WALKER, 1987. Artificial seeds for plant propagation. *Trends in Biotechnology*, 5(12):335-339.
- GAMBORG, O., R. MILLER, and K. OJIMA, 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, 50:151-158.
- GUPTA, P. K. and D. J. DURZAN, 1987. Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plant regeneration in loblolly pine. *Bio/technology*, 5:147-151.
- KUKLIN, A. I., P. D. DENCHEV, A. I. ATANASSOV and A. H. SCRAGG, 1994. Alfalfa embryo production in airlift vessels via direct somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 38:19-23.
- LIND, J. L., K. HEIMANN, E. A. MILLER, C. VAN ULJET and N. J. HOOGENRAAD, 1997. Substratum adhesion and gliding in a diatom are mediated by extracellular proteoglycans. *Planta*, 203:213-221.
- MAGAÑA, I. P., 1987. Información personal. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, Unidad Zacatenco, México, D.F.
- MCDONALD, K. and A. P. JACKMAN, 1989. Biorreactor studies of growth and nutrient utilization in alfalfa suspension cultures. *Plant Cell Rep.*, 8:455-458.
- MEIJER, E. G. M. and D. C. W. BROWN, 1987. Role of exogenous nitrogen and sucrose in rapid high frequency somatic embryogenesis in *Medicago sativa*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 10:11-19.
- MITTEN, D. H., S. J. SATO and T. A. SKOKUT, 1984. *In vitro* regenerative potential of alfalfa germplasm sources. *Crop Science*, 24:943-945.
- MORRIS, E. R., D. A. RESS and G. YOUNG, 1982. Chiroptical Characterization of polysaccharide secondary structures in the presence of interfering chromophores; Chain conformation of inter-junction sequences in calcium alginate gels. *Carbohydrate Research*, 108:181-195.

- MULLON, C., 1987. Curso: Diferentes procesos de inmovilización por microencapsulación. Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología. UNAM Cuernavaca, Morelos, México.
- MURASHIGE, T. and F. SKOOG, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, **15**:473-479.
- PARROT, W. A., S. A. MERKLE and E. G. WILLIAMS, 1993. Somatic embryogenesis: Potential use in propagation and gene transfer systems. In: *Synseeds: Applications of synthetic seeds to crop improvement*. Redenbaugh, K (ed.). CRC Press, pp. 158-199.
- REDENBAUGH, K., D. B. PAASCH, W. J. NICHOL, E. M. KOSSLER, R. P. VISS and A. K. WALKER, 1986. Somatic Seeds: Encapsulation of asexual plant embryos. *Biotechnology*, **4**:797-801.
- REDENBAUGH, K., P. VISS, D. SLADE and J. A. FUJII, 1987. Scale up: Artificial seeds. In: *Plant tissue and cell culture*. V.3. Green, C. E., D. A. Somers, W. P. Hackett and D. D. Biesboer (eds.) Alan R. Liss Inc. Nueva York, pp. 473-493.
- REDENBAUGH, K., J. A. FUJII and D. SLADE, 1993. Hydrated coatings for synthetic seeds. In: *Synseeds: Applications of synthetic seeds to crop improvement*. Redenbaugh, K (editor). CRC Press, pp. 35-46.
- REGH, T., C. DORGER, y C. P. CHAU, 1986. Application of an atomizer in producing small alginate gel beads for cell immobilization. *Biotechnology Letters*, **8**(2):111-114.
- REISCH, B. and E. T. BINGHAM, 1980. The genetic control of bud formation from callus cultures of diploid alfalfa. *Plant Science Letters*, **20**:71-77.
- ROCHEFORT, E. W., T. REGH and C. P. CHAU, 1986. Trivalent cation stabilization of alginate gel for cell immobilization. *Biotechnology Letters*, **8**(2):115-120.
- TAKAYAMA, S. and M. AKITA, 1994. The types of bioreactors used for shoots and embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **39**:147-156.
- TOONEN, M. A. J., E. D. L. SCHMIDT, A. KAMMEN and S. C. de VRIES, 1997. Promotive and inhibitory effects of diverse arabino galactan proteins on *Daucus carota* L. Somatic embryogenesis. *Planta*, **203**:188-195.
- VEGA, G. A. E., 1987. Embriogénesis somática en apio (*Apium graveolens* L. tipo Tall Utah 52-70) Tesis profesional. UNAM. Facultad de Ciencias, p. 79.
- VILLEGAS, G. T. L. y D. C. W. BROWN, 1986. A revised medium for increasing yields in Alfalfa somatic embryos. *Internationalsl Congress in Plant Tissue Culture*. Minneapolis-St. Paul, Minnesota.
- VILLEGAS, G. T. L., 1991. Embriogénesis somática en *Medicago sativa* L. y la fisiología de su desarrollo. Tesis doctoral. ENCB, IPN. México.