



**UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**DESARROLLO DE PROTOPLASTOS DE ZANAHORIA
DAUCUS CAROTA L PARA SU USO EN TRANSFECCIÓN
GENÉTICA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA**

**ALUMNO: HARLEY FUENTES A.
PROFESOR GUÍA: CARLOS FIGUEROA L.**

**TALCA – CHILE
2019**

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2019

AGRADECIMIENTOS

La presente memoria de título fue financiada por CONICYT, Fondecyt, Regular N° 1140663 y 1181310.

Agradecimientos a la Ingeniera en Biotecnología Vegetal Srta. Paz Zúñiga por su gran ayuda, disposición y paciencia durante todo el proceso de desarrollo de la presente memoria de título.

ÍNDICE

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
3. Revisión bibliográfica.....	4
3.1. Cultivo vegetal <i>in vitro</i>	
3.2. Medios de cultivo vegetal y sus principales componentes nutricionales	
3.3. Cultivo <i>in vitro</i> de callos	
3.4. Cultivo en suspensión <i>in vitro</i>	
3.5. Protoplastos de células vegetales	
3.6. Electroporación	
3.7. Gen reportero GUS	
4. Hipótesis.....	20
5. Objetivos.....	21
6. Materiales y métodos.....	22
6.1. Esterilización de semillas de zanahoria	
6.2. Germinación de semillas de zanahoria <i>in vitro</i>	
6.3. Embriogénesis	
6.4. Estandarización de cultivo <i>in vitro</i> de callos en medio sólido	
6.5. Cultivo celular de callos en suspensión	
6.6. Subcultivo celular en medio líquido	
6.7. Cuantificación de crecimiento celular en cultivo líquido	
6.8. Producción de protoplastos a partir de callos en suspensión	
6.9. Cuantificación de protoplastos	
6.10. Extracción y purificación de gen GUS	
6.11. Electroporación de protoplastos	
6.12. Detección histoquímica de GUS	
7. Resultados.....	31
8. Discusión.....	38
9. Conclusión.....	42
10. Bibliografía.....	43

1. RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar una línea celular de protoplastos de zanahoria (*Daucus carota* L.) estable y útil para la transfección genética. Para esto se realizaron cultivos *in vitro* de semillas, las cuales se hicieron germinar hasta la formación de plántulas, de las cuales se extrajo un segmento que a través de embriogénesis en medio MS suplementados con sacarosa, vitaminas y hormona 2,4 – D fueron transformados en callos.

Los callos fueron trozados e inoculados en medio MS en suspensión suplementado con azúcar, vitaminas, hormonas (ANA y kinetina) y se mantuvieron en este medio realizando subcultivos cada 10 días para la mantención de su viabilidad.

Los cultivos en suspensión fueron tratados con un complejo de enzimas fúngicas degradadoras de pared celular formando protoplastos, los cuales fueron transfectados a través de electroporación con el gen GUS.

2. INTRODUCCIÓN

En el campo de la investigación biológica una de las mayores problemáticas ha sido dilucidar los procesos bioquímicos llevados a cabo en la naturaleza. Dentro de estos reinos está el vegetal, comprendido por una vasta diversidad de especies las cuales tienen impacto directo sobre los ecosistemas y son parte fundamental de la alimentación y desarrollo de otros seres vivos.

Para poder estudiar y comprender la totalidad de procesos metabólicos llevados a cabo por los organismos vegetales es de utilidad desarrollar un sistema seguro y confiable que pueda garantizar su correcto estudio, a raíz de esto diversos investigadores han propuesto alternativas que se adaptan a sus necesidades. Uno de estos métodos es el cultivo de células vegetales *in vitro* el cual es un método ampliamente utilizado en investigación debido a sus múltiples usos entre los cuales destacan estudios fisiológicos, bioquímicos, relacionados al ciclo celular, mejoramiento genético, etc. No solo sus usos son variados, sino también la manera en la que se pueden llevar a cabo dependiendo del tipo de tejido vegetal con el que se trabajará y el propósito.

Debido a los distintos factores que pueden influir en el desarrollo de las células vegetales la técnica de cultivo se estandariza de acuerdo a los requerimientos del

operador, por esta razón el protocolo estándar propuesto para realizar el cultivo puede variar tanto en composición como en condiciones de mantenimiento. Dentro de la composición de este cultivo se pueden utilizar distintos tipos celulares.

En el presente trabajo se utilizaron células de callo de zanahoria (*Daucus carota* L.) las cuales han demostrado ser una herramienta útil y válida para el estudio celular, sin embargo, para la finalidad que se quiere obtener estas células deben ser transformadas a partir de procesos enzimáticos a protoplastos o células vegetales sin pared celular, debido a que bajo esta condición se podrá estudiar a través de transfección génica.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cultivo de tejido vegetal *in vitro*

Este método se denomina así debido a que se cultiva un inóculo de células con alta capacidad de diferenciación (1) el cual puede corresponder a células, tejidos, órganos, embriones, callos o plantas enteras (2). Este inóculo puede ser cultivado tanto en un medio nutritivo en estado líquido (suspensión) o bien solidificarse con agar (3), estando contenido en recipientes de vidrio, plástico u otro material bajo condiciones asépticas. Se pueden modificar variables como la temperatura (alrededor de 24 °C), pH (en un rango de 5,5 – 5,8), humedad, ciclos de luz y oscuridad, etc. Otro factor importante y altamente variable entre un cultivo y otro es el medio nutritivo, el que cambiará en composición y concentración según el tipo de tejido vegetal y el aspecto a investigar como su comportamiento metabólico, fisiológico y bioquímico (4).

La principal utilidad que se le ha dado a la técnica de cultivos vegetales *in vitro* a lo largo de la historia ha sido comprender el rol que poseen las sustancias sintetizadas como los metabolitos secundarios y las hormonas junto con dilucidar las rutas metabólicas en las cuales están involucradas. Actualmente esta herramienta es utilizada para experimentos de ingeniería genética, principalmente orientado a la producción de plantas transgénicas a

partir de cultivos celulares o protoplastos (células vegetales sin pared celular) que han sido transfectadas con DNA exógeno (5).

3.2 Medios de cultivo vegetal y sus principales componentes nutricionales

El conocimiento sobre los requerimientos nutricionales que presentan los vegetales o partes específicas de estos ha permitido desarrollar protocolos dirigidos para su crecimiento satisfactorio, la mantención de poblaciones celulares y la proliferación *in vitro* (5).

Los macronutrientes son elementos fundamentales en los cultivos vegetales debido a que a través de ellos se obtiene la base estructural para el crecimiento y replicación celular. En estos se incluyen los elementos como carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio (6).

Los micronutrientes, denominados así debido a que se encuentran en proporciones menores que los macronutrientes (de 1 a 4 órdenes de magnitud inferior), presentan como principal función formar parte estructural y funcional de las metaloenzimas catalizando reacciones enzimáticas involucradas en la síntesis proteica (7), entre estos elementos se incluyen el zinc que se considera clave en reacciones enzimáticas que requieren electrófilos, otros como el hierro, manganeso, cobre y molibdeno se encuentran involucrados en transformaciones redox, siendo el hierro el micronutriente más abundante (6, 8).

La fuente de carbono más utilizada por los vegetales es la sacarosa, seguida por la maltosa, lactosa y galactosa, las que han demostrado ser menos efectivas que la primera. La sacarosa es un disacárido formado por alfa-glucopiranososa (glucosa) y beta-fructofuranosa (fructosa), estos dos compuestos son utilizados con mayor eficiencia por las células vegetales que la sacarosa y se pueden obtener tras la hidrólisis producida por el proceso de autoclave en el laboratorio (6, 7, 9). La principal función de la sacarosa es proveer sustratos para la producción de energía y síntesis de productos celulares, ya que se ha comprobado que es una molécula que conserva una alta energía libre de hidrólisis en sus enlaces. (9)

Se ha estudiado que algunas vitaminas están involucradas activamente en el desarrollo de las células vegetales y la utilización varía dependiendo de la naturaleza de la planta o el explante con el que se trabaje. Estas pueden actuar como factores de crecimiento, aunque también se han asociado como un factor limitante en experimentos realizados *in vitro* (6). Debido a esto se ha concluido en que no todas las vitaminas son indispensables para el correcto desarrollo vegetal y, más aún, algunas pueden ser omitidas en la preparación de medios de cultivo sin alterar el correcto crecimiento (10).

Las vitaminas más comúnmente utilizadas en los medios de cultivo son la tiamina (vitamina B1), ácido nicotínico o niacina y la piridoxina (vitamina B6).

La tiamina o vitamina B1 es usualmente añadida a los medios de cultivo como hidrocloreuro de tiamina, se considera esencial para el desarrollo celular y es necesaria para

el crecimiento actuando como un cofactor en el metabolismo de los carbohidratos y la síntesis de algunos aminoácidos, más aún, se ha observado que la disminución en su concentración en cultivos en suspensión ha conllevado a la necrosis y la detención del crecimiento celular (6, 9).

El ácido nicotínico es usualmente agregado a los medios de cultivo, aunque no todas las especies lo necesitan para su desarrollo, como en el caso de la tiamina. Forma parte de las coenzimas NAD y NADP, nucleótidos fundamentales en el metabolismo energético y reacciones de óxido reducción (11).

La piridoxina junto con el piridoxal y la piridoxamina se denominan en conjunto bajo el nombre de vitamina B6. Esta actúa como cofactor en una gran variedad de reacciones enzimáticas, mayormente en las involucradas con el metabolismo de aminoácidos, realizando la función de transferencia de grupos amino acoplado a las transaminasas (12).

Un punto fundamental del cultivo *in vitro* es la regulación del crecimiento y desarrollo de los tejidos. Esto se lleva a cabo gracias a las fitohormonas, entre las cuales se destacan las citoquininas y auxinas.

En cuanto a las citoquininas estas son derivadas de la adenina, que poseen una cadena isoprenoide o aromática lateral en la posición N6 de la purina. La primera en ser identificada y que es ampliamente utilizada en investigación es la kinetina.

Los estudios sugerían que la síntesis de estas hormonas ocurría en las raíces de las plantas, aunque en estudios recientes se comprobó que puede ocurrir inespecíficamente en toda la planta. Su señalización parte desde su unión a receptores de membrana llamados AHKs, una cascada de fosforilaciones con la posterior translocación de las fosfotransferasas AHPs al núcleo y la activación de la transcripción de los reguladores de respuesta (ARRs) lo que produce un feedback negativo hacia la síntesis de las mismas citoquininas y el inicio de nuevas rutas metabólicas. Esta hormona participa en distintos procesos como el desarrollo embrionario, vascular, germinación, promueven la diferenciación celular, e incluso, están involucradas en la muerte celular (13, 14).

Las auxinas han sido identificadas como hormonas reguladoras de crecimiento en plantas. La principal auxina descubierta y que se presenta de manera natural es el ácido indol acético (IAA), la cual posee una estructura similar a la encontrada en el aminoácido triptófano. La función de esta fitohormona radica en su habilidad de estimular el crecimiento diferencial en respuesta a la gravedad o los estímulos de luz, permite regular el cambio en la tasa de elongación de las células vegetales, controlando cuan largo pueden llegar a crecer (15-17).

Se ha descubierto que las auxinas tienen la capacidad de desencadenar respuestas no transcripcionales de manera rápida como activación de bombas de iones y el reordenamiento del citoesqueleto. Aunque también están involucradas en la activación de diversos genes. Entre las rutas metabólicas en las cuales las auxinas están involucradas se encuentran las que tienen relación al ciclo celular y proliferación.

Una de estas es la vía de la proteína de unión a auxina (ABP-1) la cual se relaciona a la activación de bombas de eflujo (18). Se ha estudiado que la inactivación de estas proteínas induce un arresto en el ciclo celular, y se ha demostrado en modelos de Arabidopsis que su inactivación produce alteraciones en la división celular en los tejidos meristemáticos.

A pesar de que esta se sintetiza de manera natural en las plantas, el conocimiento de las auxinas y su comportamiento en los tejidos vegetales se ha podido estudiar de mejor manera con auxinas sintéticas como NAA y 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 – D) (16).

Una de las auxinas más utilizadas en la agricultura y la investigación vegetal es el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Esta es una auxina sintética que posee un efecto herbicida útil para el control de malezas y en una gran variedad de entornos de cultivo. Su efecto lo ejerce principalmente en las zonas meristemáticas de las raíces y los brotes, produciendo una estimulación del crecimiento de las células jóvenes incontrolada e insostenible lo que conlleva a un crecimiento anormal y el marchitamiento de la planta y su posterior muerte. Debido a sus efectos en el desarrollo y división celular también se ha utilizado como regulador de crecimiento en cultivos vegetales. Otro efecto tóxico que produce sobre el tejido vegetal es el aumento de la producción de especies reactivas del oxígeno, lo que aumenta el estrés oxidativo. Se han observado metabolitos secundarios derivados de 2,4-D en plantas y callos vegetales de manera natural (19-23).

El medio de cultivo de células vegetales Murashige y Skoog (MS) (24) fue desarrollado por los científicos Toshio Murashige y Folke K. Skoog en 1962, durante sus investigaciones de nuevos reguladores del desarrollo vegetal y se ha convertido en el medio más comúnmente usado en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales (25). Este medio contiene macronutrientes que incluyen altos niveles de nitrato y aditivos orgánicos como azúcar, vitaminas y pueden ser suplementados con reguladores de crecimiento como kinetina y auxinas en las que destacan ANA y 2,4 – D.

3. 3 Cultivo *in vitro* de callos

Uno de los tejidos vegetales más utilizados para la investigación son los callos definidos como una masa amorfa de células indiferenciadas surgida de la proliferación de células del parénquima. Se pueden producir en base a heridas de las plantas, como cortes de tallo o raíz. Los callos no tienen patrones predecibles de organización, están presentes en centros localizados de actividad meristemática y una de sus características más importantes es la capacidad para poder diferenciarse en las distintas partes de la planta, definiéndose por lo tanto como células con potencial de diferenciación. Los estímulos implicados en la formación de un callo a partir de una herida son las hormonas auxinas y kinetina. Además de la lesión mecánica, el callo se puede producir en los tejidos vegetales después de una invasión por ciertos microorganismos o por alimentación de los insectos (26, 27).

El cultivo de callos de células vegetales se realiza en medios sólidos nutritivos y consta de tres etapas en su desarrollo: inducción, división celular y diferenciación. En la primera etapa las células son estimuladas como respuesta a los nutrientes del medio preparándose para la siguiente fase. En la segunda fase las células se dividen activamente y debido al componente y la concentración hormonal del medio los cultivos pueden ser mantenidos y subcultivados sin necesidad de pasar a la diferenciación. La fase de diferenciación ocurre si los callos son subcultivados en un medio sin hormona, y el tejido en el que se diferenciará dependerá de los estímulos nutricionales o ambientales que se utilicen (26).

3.4 Cultivo en suspensión *in vitro*

Este método de cultivo consiste en la inoculación de células vegetales en un medio líquido nutritivo contenido generalmente en un matraz Erlenmeyer. Es útil para promover el crecimiento y la separación de las células vegetales, definiendo como un buen cultivo en suspensión aquel que posea un alto porcentaje de células individuales y menor cantidad de células agregadas (2). Este tipo de cultivo se realiza en agitación constante a 80 – 150 rpm, que se considera un punto crítico en la técnica, el cual garantiza el suministro correcto de oxígeno a las células (25), previene la sedimentación de los agregados, previene efectos del estrés celular e influye en la viscosidad del fluido. La temperatura comúnmente utilizada varía alrededor de los 25°C. Además, este tipo de cultivo puede ser mantenido de manera indefinida a través de subcultivos continuos semanales y suministro de nutrientes adecuado.

Al iniciar el cultivo en suspensión se debe inocular el medio líquido nutritivo con una cantidad similar del explante en proporciones que van desde 1: 1 hasta 1:4, preferentemente. A medida que se realizan los subcultivos la dilución puede aumentar llegando a 1: 5, tasa de dilución que se puede mantener constante y puede variar según el uso del cultivo (28).

Los cultivos celulares en suspensión presentan distintas fases de crecimiento (**fig. 1**). En primer lugar, se presenta una fase inicial o de retraso, en la cual se induce el metabolismo replicativo de las células. Este dependerá de las condiciones fisiológicas del explante y de la composición y condiciones del medio de cultivo. El cultivo presentará un crecimiento lento durante 1 a 3 días (2, 25, 28, 29). Luego de la fase de retraso viene la fase exponencial la que es de corta duración y dependerá del tejido utilizado. En esta fase se presentan células en un alto estado replicativo y en menor cantidad células que no se dividen (28). El crecimiento exponencial disminuye dando paso a la fase lineal en la cual la tasa de división celular disminuye, dando paso a una desaceleración progresiva y finalmente a una fase estacionaria en la cual se detiene la división celular con el fin de mantener la viabilidad del cultivo y la sobrevivencia de las células frente a la disminución de los nutrientes del medio y la acumulación de desechos metabólicos. Es en esta última fase en la que se realizan los subcultivos posteriores (5, 28). Se ha demostrado que la realización de subcultivos tardíamente durante la fase estacionaria, resulta en fases de retraso más largas y menor viabilidad celular (29).

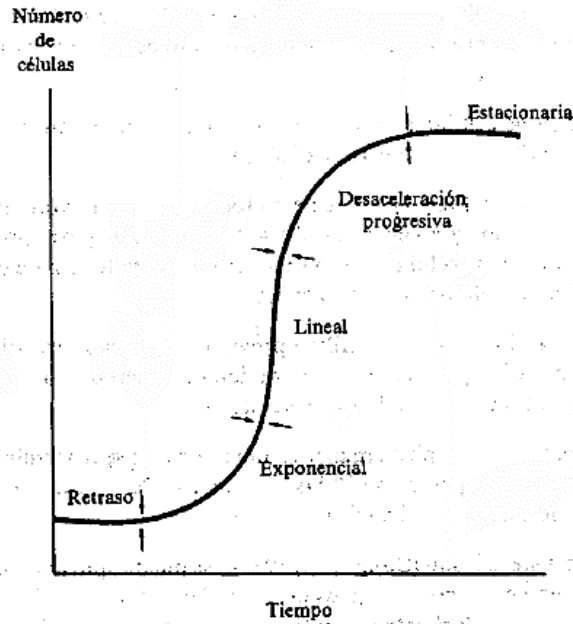


Figura 1. Curva de crecimiento típica. Representación de las distintas fases de crecimiento (retraso, exponencial, lineal, desaceleración progresiva y estacionaria) en un cultivo cerrado (28).

Este tipo de cultivo ha demostrado ser inestable debido a factores externos como la contaminación por microorganismos y factores internos como mutaciones cromosómicas los cuales aumentan a medida que se van realizando subcultivos celulares.

3.5 Protoplastos de células vegetales

Se denomina protoplasto a toda célula que se encuentre desprovista de su pared celular, ya sean bacterias, hongos y plantas. En cuanto a las células vegetales se conoce que posee una pared compuesta en gran mayoría por celulosa, formada por cadenas de glucano unidas por enlaces glucosídicos β - 1,4 y otros polisacáridos de matriz que se pueden dividir

en dos tipos, los polisacáridos pécticos como el homogalacturonano y el ramnogalacturonano I y II, y los polisacáridos hemicelulósicos como los xiloglucanos, glucomananos y xilanos principalmente (30). También se pueden encontrar otros componentes de origen lipídico y proteico. Esta pared celular cumple un rol clave como soporte de la estructura celular, unión a otras células adyacentes, comunicación intracelular y en la defensa contra microorganismos patógenos como bacterias, hongos y virus.

Los protoplastos son células frágiles sensibles a los estímulos mecánicos, composición y osmolaridad del medio, lo que dificulta su mantención en el cultivo por tiempo prolongado y exige añadir la concentración correcta de sales y nutrientes necesarios para su viabilidad (31).

La digestión de la pared celular se lleva a cabo gracias a la acción de enzimas hidrolíticas fúngicas, que al actuar sobre la pared, provocan que la célula pierda su forma característica cambiando a estructuras esféricas o globosas que solo poseen la membrana celular como soporte estructural y barrera frente al medio externo (32).

Dentro de las enzimas utilizadas para degradar la pared vegetal se encuentran las celulasas, estas pueden ser de origen bacteriano o fúngico, en cuanto a estas últimas, pueden provenir de distintas especies como *Aspergillus* sp, *Penillium* sp. y *Trichoderma* sp. Estas enzimas se encuentran contenidas en un sistema multienzimático que además de contener celulasas se pueden encontrar hemicelulasas, pectinasas y proteasas.

En cuanto a las celulasas, que son las que poseen la mayor actividad en el conjunto enzimático, tienen la capacidad de actuar aleatoriamente sobre los enlaces glucosídicos β - 1,4 de las cadenas internas de celulosa, formando cadenas de oligosacáridos (33, 34).

Otra de las enzimas utilizadas generalmente en conjunto con las celulasas son las enzimas maceradoras, también llamadas macerozimas. Estas enzimas son ampliamente comercializadas y son aisladas de distintas especies de hongos, principalmente de *Rhizopus* sp. Al igual que las celulasas se ha reportado que las macerozimas degradan los polisacáridos estructurales, principalmente con actividad pectinasa y hemicelulasa por sobre actividad celulasa en comparación con los complejos enzimáticos celulasa descritos anteriormente (35) (36).

La necesidad de obtener protoplastos en el laboratorio radica en la importancia que se le ha dado en el campo de la bioingeniería. De los usos que más se le atribuyen están el ser material de fusión celular y su capacidad de poder ser transformados a través de ingeniería genética (37).

3.6 Electroporación

La electroporación es una técnica ampliamente utilizada en el campo de la biotecnología y el estudio genético. Esta técnica consiste en la introducción de DNA a las células a través de choques eléctricos de alto voltaje. Se fundamenta en la base de que las

membranas celulares son buenas barreras para los iones y moléculas hidrofílicas, ya que actúan como capacitadores eléctricos y por lo tanto no es posible para las moléculas pasar a través de ella libremente (38). Esta técnica es útil en una gran variedad de células entre las que se encuentran las animales, vegetales y bacterianas.

Como se mencionó anteriormente, el choque eléctrico es un proceso clave para la adquisición de material genético por las células, aunque también es un paso crítico durante la realización del experimento. Al aplicar voltaje sobre la superficie de las células se produce un desajuste temporal de esta, lo que provoca la formación de poros, por los cuales pueden ingresar macromoléculas como el DNA (39).

Para aplicar el campo eléctrico en el medio líquido que contiene las células y el DNA, se requiere un recipiente o cubeta con un extremo que posea un cátodo y otro con un ánodo, con el fin de que el DNA, que posee carga negativa, sea repelido del extremo negativo y migre hacia el sentido contrario, al tiempo que ingresa a las células a través de los poros (40).

Para volver a cerrar los poros generados en la membrana celular se necesita someter a las células a temperaturas bajas cercanas a 0°C, esto garantiza que el material genético integrado se mantenga dentro de la célula, llegue hasta el núcleo, y pueda integrarse a los cromosomas del huésped.

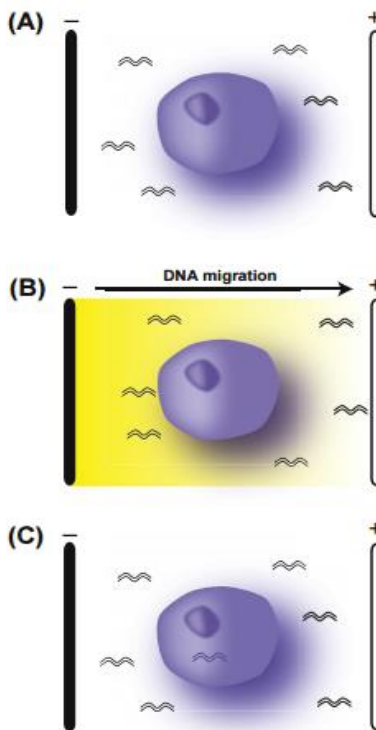


Figura 2. Electroporación. a) Célula y DNA ubicados en un contenedor con un extremo catódico y otro anódico; b) DNA migrando a través del medio y apertura de poros en las células en respuesta al campo eléctrico; c) Integración de DNA exógeno al interior de la célula (40).

3.7 Gen reportero GUS

Dentro del estudio de la expresión génica sobre poblaciones celulares de distinto origen son comúnmente utilizados los denominados genes reporteros. Estos genes tienen la capacidad de unirse a secuencias regulatorias de los genes de otros organismos y expresarse, como consecuencia se puede evaluar la abundancia, actividad del producto y la función de promotores. Las secuencias de genes más utilizadas provienen de origen bacteriano, debido a que son de fácil análisis y se pueden distinguir porque no se encuentran normalmente en el organismo estudiado, como en las células vegetales (41).

Como se mencionó en el apartado anterior, la electroporación es una de las técnicas más utilizadas para integrar estas secuencias de DNA al interior del núcleo, aunque no todo el material genético es captado por la célula, sino que solo una fracción, lo que es de utilidad cuando se quiere estudiar la expresión transiente de genes (42).

En cuanto a la expresión transiente esta se refiere a una expresión temporal y limitada del gen involucrado. Un ejemplo de este tipo de expresión se puede observar en los protoplastos vegetales, los cuales son incubados luego del proceso de transfección, tiempo en el cual se transcribe y traduce el gen reportero. Luego de esto se evalúa la presencia del producto químicamente o histoquímicamente (42).

Uno de los genes reporteros más utilizados en el laboratorio es el gen GUS, utilizado principalmente para evaluar promotores, tanto en ensayos transientes como en transformaciones estables en células vegetales. Otras funciones asociadas a este gen son el estudio de regulación hormonal, respuestas a daño, fotoregulación en vegetales y como marcador de transformación celular (41, 43).

Este gen codifica a la enzima β – glucuronidasa que cataliza la hidrólisis de una amplia variedad de glucurónidos. Sus sustratos tanto naturales como sintéticos y consisten en compuestos que poseen en su estructura el ácido D – glucurónico conjugado a través de un enlace β – o – glucosídico a cualquier aglicona.

La actividad de esta enzima de manera endógena está ausente en la mayoría de las plantas lo que le da una ventaja en cuanto a su utilidad (41, 43).

Una de las aplicaciones de GUS en el laboratorio que destaca por su robustez y simpleza es el ensayo de histoquímica, en el cual se utiliza un sustrato comercial denominado X – Gluc (ácido 5-bromo – 4 – cloro – 3 – indolil – β – D -glucurónico) que al ser hidrolizado tiene como producto un ácido glucurónico sin color junto con un intenso precipitado azul de cloro – bromoindigo, el cual puede ser visualizado a simple vista a través de microscopia (43).

4. HIPÓTESIS

El cultivo de células de callos de zanahoria (*Daucus carota* L.) en suspensión es un método efectivo para obtener protoplastos viables para su uso en técnicas de transfección genética.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Desarrollar una línea celular de protoplastos de zanahoria (*Daucus carota* L) estable y útil para la transfección genética.

Objetivos específicos

- Establecer cultivos *in vitro* de células indiferenciadas de callos de zanahoria.
- Obtener protoplastos de zanahoria mediante digestión enzimática de la pared celular.
- Evaluar la viabilidad de los protoplastos de zanahoria mediante transfección genética.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Esterilización de semillas de zanahoria

Se procedió a lavar semillas de zanahoria *Daucus carota* L. cv. Nantesa (marca Vilmorin) (**Fig. 3**) con una solución fungicida de contacto (Captan). Se llevó a la cabina un agitador magnético y sobre este un vaso de precipitado en el cual se agregaron las semillas, 50 mL de 2% (p/v) de Captan y una barra magnética. Se dejó en agitación durante 30 min, luego de esto se lavaron las semillas con agua estéril sobre un colador para quitar el exceso de fungicida. Luego del lavado se volvieron a depositar las semillas en un vaso precipitado esta vez con cloro comercial, una barra magnética y se dejó en agitación durante 40 min, nuevamente se procedió a lavar con agua estéril. Una vez lavadas se almacenaron en tubos de 1,5 mL con agua estéril (**Fig. 4**) a 4°C en oscuridad.



Figura 3. Semillas utilizadas para cultivo y embriogénesis.



Figura 4. Semillas estériles almacenadas en tubos eppendorf.

6.2 Germinación de semillas de zanahoria *in vitro*

Al siguiente día se procedió a sembrar las semillas en medio sólido 4,3 g/L MS (24) suplementado con vitaminas, 20 g/L sacarosa y 8 g/L agar planta. Las placas fueron selladas y llevadas a la cámara de cultivo en oscuridad durante 2 semanas (**fig. 5**).



Figura 5. Semillas cultivadas en medio de cultivo MS.

6.3 Embriogénesis

A las 2 semanas de germinación las plantas ya se encontraban crecidas *in vitro* por lo que se procedió a cortar con pinza y bisturí el epicotíleo e hipocotíleo de las plantas, dejando las secciones intermedias de aproximadamente 1 cm, las cuales se sembraron en un nuevo medio sólido M1 que contenía 4,3 g/L MS (24) suplementado con vitaminas, 20 g/L sacarosa, 0,5 mg/L ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 8 g/L de agar planta. Las placas fueron selladas, guardadas en oscuridad y dejadas en la cámara de incubación durante 5 semanas.

Transcurrido el tiempo los explantes fueron cambiados al medio M2 que poseía la misma composición de MS (24), vitaminas y sacarosa que el medio M1 pero con una concentración de 0,25 mg/L de 2,4-D. Las placas fueron selladas y guardadas en la cámara de incubación en oscuridad durante 5 semanas.

Luego de las 5 semanas los explantes fueron subcultivados en medio M2 nuevamente y se mantuvieron en incubación bajo las mismas condiciones descritas anteriormente hasta su traspaso a medio en suspensión.

6.4 Estandarización de cultivo *in vitro* de callos en medio sólido

En paralelo a la producción de callos en el propio laboratorio, se utilizaron callos de zanahoria obtenidos de un laboratorio externo (Prof. Claudia Stange, Fac. Ciencias, U. de Chile). Estos callos fueron extraídos de su placa original para ser fragmentados con pinza y bisturí, luego se subcultivaron en el medio de cultivo sólido MS (24) con vitaminas (1 g/L tiamina, 1g/L piridoxina, 1g/L ácido nicotínico y 4g/L glicina) depositando entre 8 a 15 fragmentos del callo inicial en los nuevos medios. Las placas fueron selladas y posteriormente almacenadas en una cámara de cultivo a una temperatura de 25°C y con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. Los callos fueron traspasados a medio en suspensión al cabo de 2 semanas, y fueron mantenidos en paralelo durante el transcurso del experimento.

6.5 Cultivo celular de callos en suspensión

Para este paso se utilizó medio MS (24) comercial (4,3 g/L) (Duchefa, Alemania) suplementado con 40 g/L sacarosa, vitaminas (1 g/L tiamina, 1 g/L piridoxina, 1 g/L ácido nicotínico y 4g/L glicina), 0,4 mg/L kinetina y 2 mg/L ANA (ácido 1-naftalenacético). Se dispensaron 50 mL de este medio líquido en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Los callos cultivados previamente se fragmentaron y se pesaron 2 cantidades distintas, una con mayor peso que se denominó como la muestra (+) callos y otra de menor

peso denominada (-) callos. Luego se depositaron en 2 matraces distintos con medio líquido.

Tras la inoculación, los matraces fueron sellados con una tapa y llevados a un agitador orbital (modelo KS 260, IKA, Alemania) (**Fig. 6**) programado a una velocidad de 0,35 xg en oscuridad. A los 10 días de agitación se procedió a realizar el cambio de medio.



1

Figura 6. Matraces sellados ubicados sobre agitador automático programado a 200 rpm.

6.6 Subcultivo celular en medio líquido

Tras 10 días de agitación, los dos cultivos fueron llevados a la cabina de bioseguridad. De estos cultivos antiguos se extrajeron 15 mL que fueron inoculados en

matraces con 45 mL de medio MS (24) nuevo completando un volumen final de 50 mL por matraz.

Estos matraces fueron tapados y llevados nuevamente a agitación a 0,35 xg en oscuridad repitiendo el ciclo de 10 días hasta el próximo cambio, fueron mantenidos así por tiempo indefinido en el caso de repetir algún experimento.

Los 45 mL de cultivo con callos que sobraron de las muestras (+) callos y (-) callos fueron traspasados a tubos de 50 mL y se utilizaron para los procedimientos que se describen a continuación.

6.7 Cuantificación de crecimiento celular en cultivo líquido

Para evaluar la presencia y el número de células en el cultivo se realizó la cuantificación celular utilizando un hemocitómetro (modelo Neubauer-improved dark line, Marienfeld, Alemania). Los dos tubos obtenidos anteriormente fueron centrifugados a 200 xg por 5 min. Luego se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 1 mL de medio MS. Luego de homogenizar el contenido de los tubos se sacaron alícuotas de 15 μ L de ambos tubos los que fueron depositados en el hemocitómetro, se realizaron los recuentos por triplicado para cada tubo. El recuento se realizó en un cuadro grande (sin contabilizar las células que tocaban los bordes exteriores de estos). Las células que tienden a formar aglomeraciones fueron contadas de igual forma. La concentración de células por mL de cultivo fue determinada por la fórmula entregada por el fabricante.

$$\begin{aligned} \text{Células/ mL} &= \text{células contadas} / [(0,1 \text{ cm} \times 0,1 \text{ cm}) (\text{superficie}) \times (0,01\text{cm}) (\text{profundidad}) = \\ &= \text{células contadas} / 0,0001 \text{ cm}^3 (\text{mL}) \end{aligned}$$

6.8 Producción de protoplastos a partir de callos en suspensión

Para la producción de protoplastos se utilizaron los mismos tubos (+) callo y (-) callo con los que se realizó el recuento, se volvieron a centrifugar a 200 xg por 5 min.

El sobrenadante fue descartado, y se agregó a cada tubo 5 mL de la solución enzimática de 1% (p/v) cellulase (Onozuka R-10, Duchefa), 0,1% (p/v) macerozyme R-10 (Duchefa), 20 mM MES (Sigma - Aldrich), 5 mM CaCl₂, y 0,6 M manitol (Sigma- Aldrich) pH 5,6, esterilizada por filtración (0,22 μm, Millipore). Los tubos se homogenizaron y el contenido fue traspasado a placas de poliestireno de 6 pocillos. La digestión enzimática se llevó a cabo en incubación toda la noche, en oscuridad, con agitación constante a 0,35 xg, a 26 ± 2°C.

Luego de la incubación se extrajo el contenido de los pocillos y se filtró en un tamiz de 70 μm (Filtro de células Falcon™, Thermo Fisher scientific) ubicado sobre un tubo de 50 mL. El filtrado que quedó en los tubos de 50 mL fue traspasado a un nuevo tubo de 15 mL los que fueron centrifugados a 100 xg por 5 min. El sobrenadante fue descartado y el pellet resuspendido en 8 mL de solución de suspensión (0,5 M sacarosa, 1 mM MES) y 2 mL de

medio W5 (154 mM de NaCl, 125 mM de CaCl₂, 5 mM de glucosa y 5 mM de KCl, pH 5,6) (44). La solución fue centrifugada a 100 xg por 12 min.

Luego de la centrifugación se eliminó el sobrenadante de los tubos y los protoplastos que quedaron en el pellet fueron resuspendidos en 1 mL de medio W5 (44).

6.9 Cuantificación de protoplastos

Para evaluar la cantidad de protoplastos producida a partir de los callos en los tubos (+) callos y (-) callos se realizó un nuevo recuento celular utilizando el hemocitómetro (modelo Neubauer-improved dark line, Marienfeld, Alemania). El procedimiento fue idéntico al mencionado en el recuento de callos, realizando un recuento por triplicado.

6.10 Extracción y purificación de gen GUS

Para obtener el DNA utilizado en la electroporación se procedió a extraer y purificar el gen GUS contenido en una cepa de *E. coli* DH5 α previamente transformada y almacenada en refrigeración. Para llevar a cabo este paso se utilizó un kit comercial (E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit II, OMEGA bio – tek). Las muestras de DNA se almacenaron en tubos Eppendorf de 1,5 mL en congelación hasta su uso.

6.11 Electroporación de protoplastos

Los protoplastos obtenidos tanto en las muestras (+) callos y (-) callos fueron recolectados en un único tubo de 15 mL y fue centrifugado a 100 xg por 5 min. El sobrenadante se eliminó y el pellet se resuspendió en 850 mL de buffer de electroporación (45) (10 mM de Hepes, 150 mM de NaCl, 5 mM de CaCl₂, 0.2 M de manitol, pH 7.2).

Se dispensaron 280 µL de esta solución en tres cubetas de electroporación (electroporation cuvettes plus, BTX) de 0,4 cm de ancho, y se adicionó a cada cubeta 100 µl de DNA GUS a 61,06 µg/ mL.

Se incubaron las muestras durante 10 min en hielo. El dispositivo de electroporación (Gene pulser II, electroporation system, BIO – RAD) fue configurado a 5 pulsos cuadrados con fuerza de campo eléctrico de 500 v/cm condiciones en las cuales se electroporaron dos de las muestras, y a 700 v/cm la muestra restante. Luego de la electroporación se incubaron las muestras en hielo durante 10 min. El contenido de las cubetas se depositó en una placa de poliestireno de 6 pocillos y se agregó a cada uno 760 µL de medio MS (24) suplementado con hormonas. Las muestras fueron incubadas en oscuridad por 24 h a temperatura ambiente.

6.12 Detección histoquímica de GUS

Luego de las 24 h de incubación se le adicionó a los 3 pocillos 1 mL de X – Gluc (ácido 5-bromo – 4 – cloro – 3 – indolil – β – D -glucurónico) (Thermo Fisher scientific)

diluido previamente en buffer de tinción (1 M de NaH_2PO_4 pH 7.0; 0.5 M de EDTA, pH 8.0; 10% (v/v) de Triton X-100, 50 mM de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ y 0.1 M de X-Gluc (50 mg/ml) en dimetilsulfuro. Se dejó incubar la muestra y el sustrato durante 4 h y se procedió a observar a través de microscopía.

7. RESULTADOS

Las semillas de *D. carota* esterilizadas y sembradas *in vitro* germinaron luego de 4 días en oscuridad (**Fig. 7.a**). Si bien la esterilización resultó ser suficiente para la mayoría de las semillas, varias de ellas presentaron contaminación por hongos (**Fig. 7.b**), por lo que se procedió a descartar las placas contaminadas.

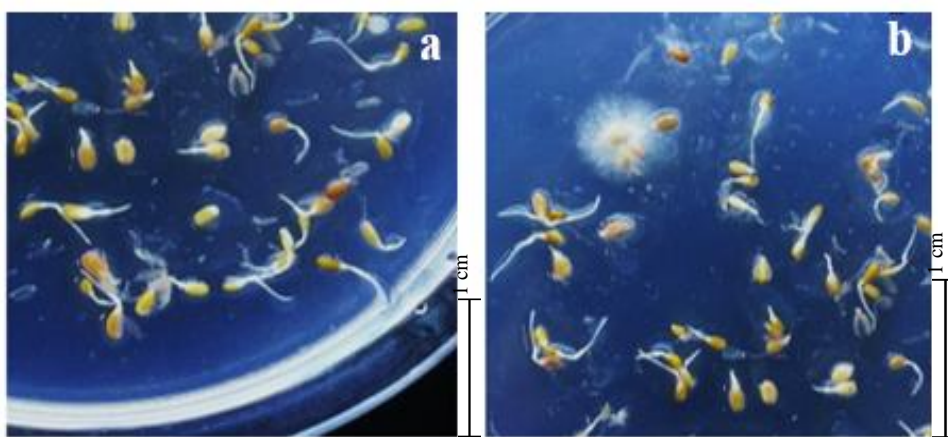
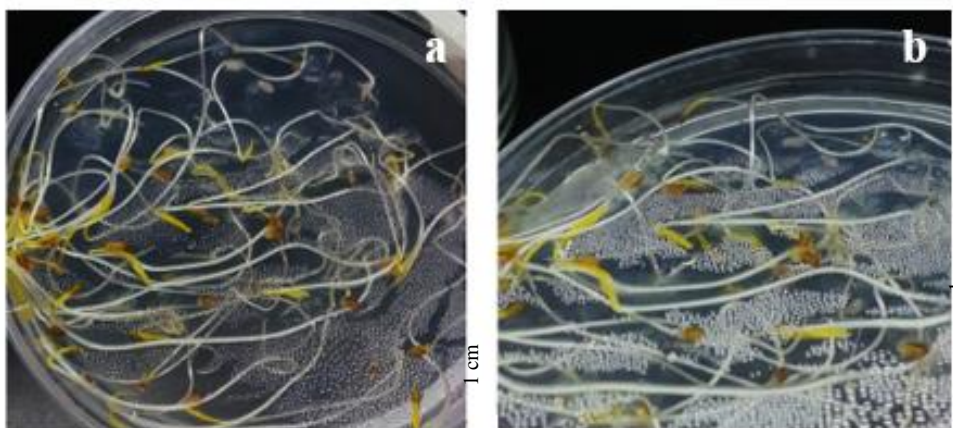


Figura 7. Cultivo de semillas de zanahoria *in vitro*. a) Germinación de semillas a los 4 días de sembradas; b) Cultivo de semillas contaminado con hongo endófito.

A las 2 semanas de iniciada la germinación las plántulas presentaron crecimiento pudiendo diferenciarse segmentos como el epicotileo e hipocotileo (**Fig 8. a, b**).



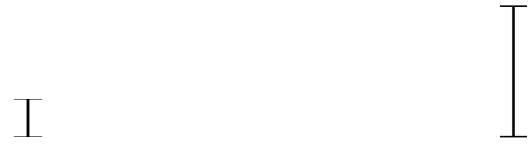


Figura 8. germinación *in vitro* de semillas de zanahoria. a, b) Plántulas germinadas *in vitro* luego de 2 semanas en cámara de crecimiento, en oscuridad a 24°C.

Los segmentos que fueron cortados y subcultivados en medio M1 a partir de las plántulas presentaron crecimiento a las 2 semanas. Se observaron protuberancias y ensanchamientos irregulares en las zonas de los extremos, en las que se habían realizado los cortes previamente (**Fig. 9.a**), también se observaron segmentos que se secaron y cambiaron su aspecto y color (**Fig. 9.b**).

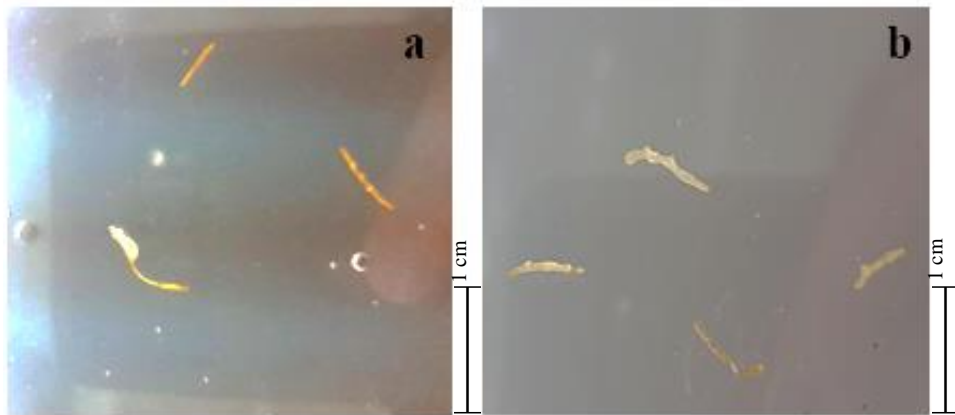
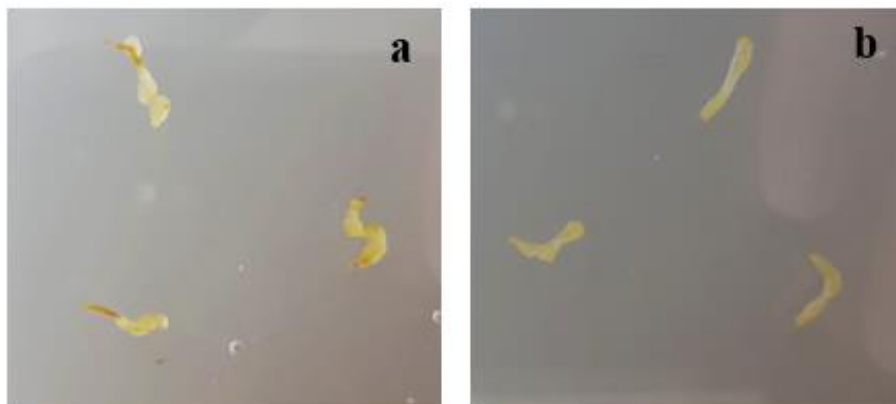


Figura 9. Formación de callos a partir de los segmentos cortados de las plántulas a las 2 semanas y subcultivados en medio M1. a) Se observan los segmentos formando protuberancias e irregularidades en comparación a la forma que poseían al formar parte de la plántula b) Segmentos secos y con coloración parduzca.

A la 4ta. semana de cultivo en medio M1 los callos siguieron presentando



crecimiento, las protuberancias se acentuaron y pasaron desde la forma cilíndrica y alargada presentada a las 2 semanas a una forma irregular y de mayor grosor (**Fig. 10 a,b**).



Figura 10. Callos cultivados en medio M1 a las 4 semanas. a, b) se pueden observar callos de distinto grosor, forma y coloración.

Luego de las 5 semanas, los callos fueron subcultivados en medio M2 en el cual siguieron creciendo, presentando un mayor engrosamiento debido a las protuberancias y un cambio de coloración con tendencia al oscurecimiento (**Fig. 11**).



Figura 11. Callos a las 6 semanas de ser mantenido en medio M2.

La cantidad de callos pesada para la muestra (+) callo fue de 0,213 g y la muestra (-) callos fue de 0,03 g (**Fig. 12, a**), mientras que los recuentos celulares realizados a los 10 días de cultivo en suspensión fueron de un promedio de $1,08 \times 10^6$ cél/ mL y $7,3 \times 10^5$ cél/ mL, respectivamente (**Fig. 12, b**). Se evidenció una correlación entre el peso de los callos inoculados en las muestras y el número de células contadas.

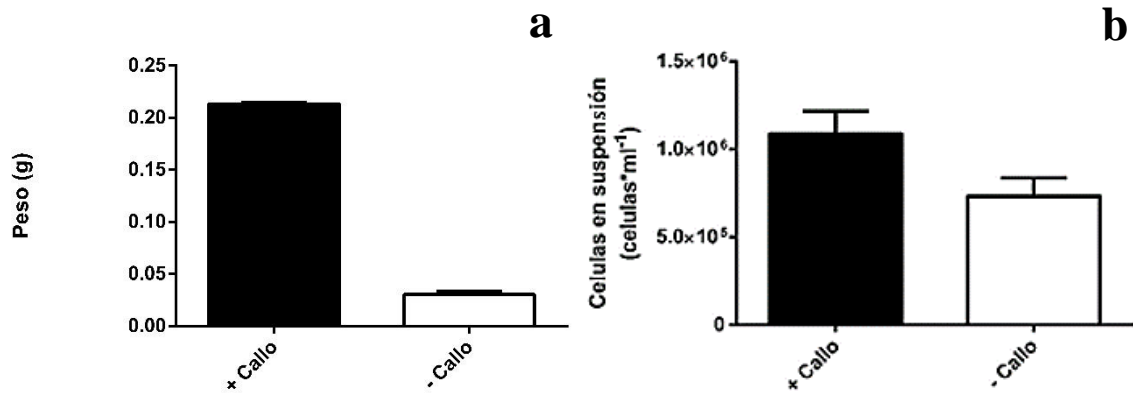


Figura 12. Peso de callos inoculados y conteo de células en suspensión. a) Comparación del peso de los callos inoculados en las muestras (+) callo y (-) callo; **b)** Comparación del recuento de células encontrados en las muestras (+) callo y (-) callo.

Los callos inoculados en cultivo líquido provenientes de la muestra (+) callos (**Fig. 13, a**) presentaron una tendencia a formar estructuras grumosas de gran tamaño (**Fig. 13, b**). Por lo tanto, fue necesario que permaneciera en agitación constante para separarlas durante los 10 días de cultivo en suspensión.

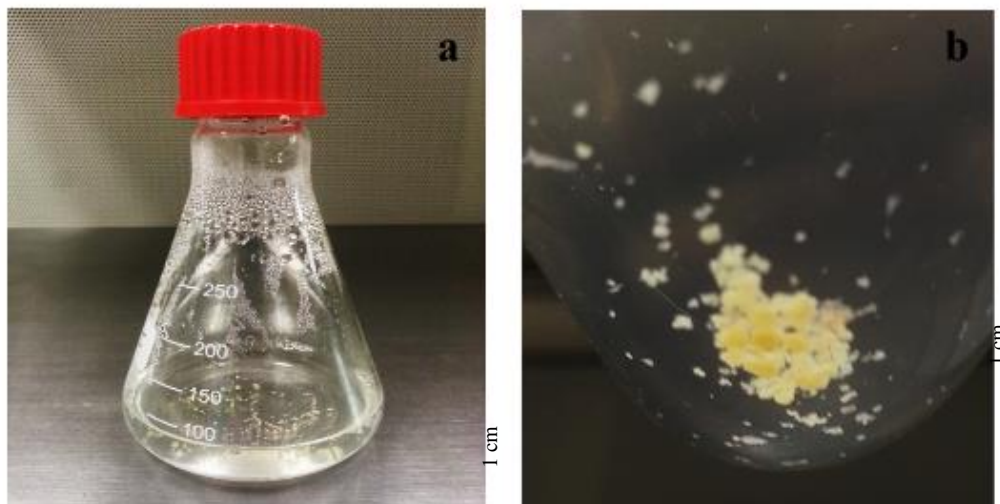


Figura 13. Cultivo *in vitro* de callos en medio líquido de muestra (+) callos. a) Matraz con medio de cultivo y callos visibles en su interior en forma de arenilla; b) Amplificación de imagen, se puede observar callos en forma de grumos y arenilla depositados al fondo del matraz.

Al momento de realizar el conteo celular se pudo observar la morfología de las células de callo. Destacaban por ser de estructura irregular que iban desde formas esféricas a formas ovaladas, e incluso arriñonadas. En algunos campos se observaron agregados celulares de tamaños variables (**Fig. 14, a**). En otros campos se pudieron observar células aisladas (**Fig. 14, b**).

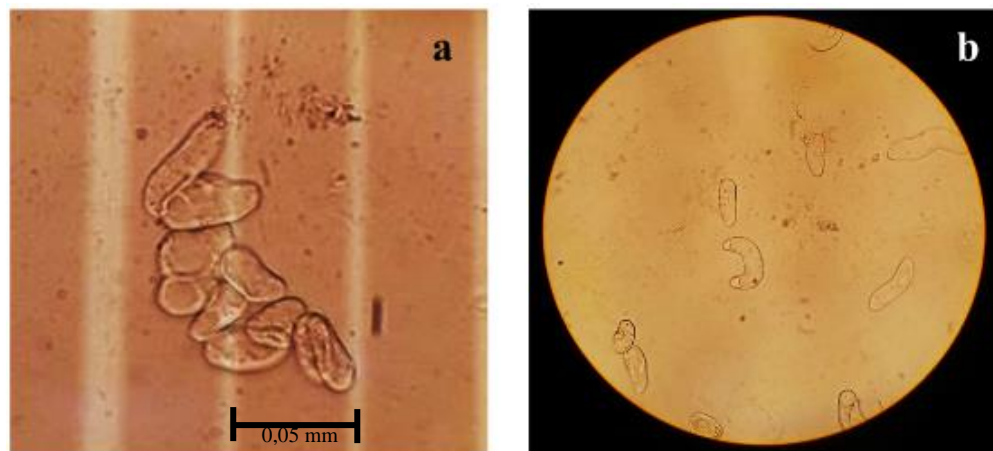
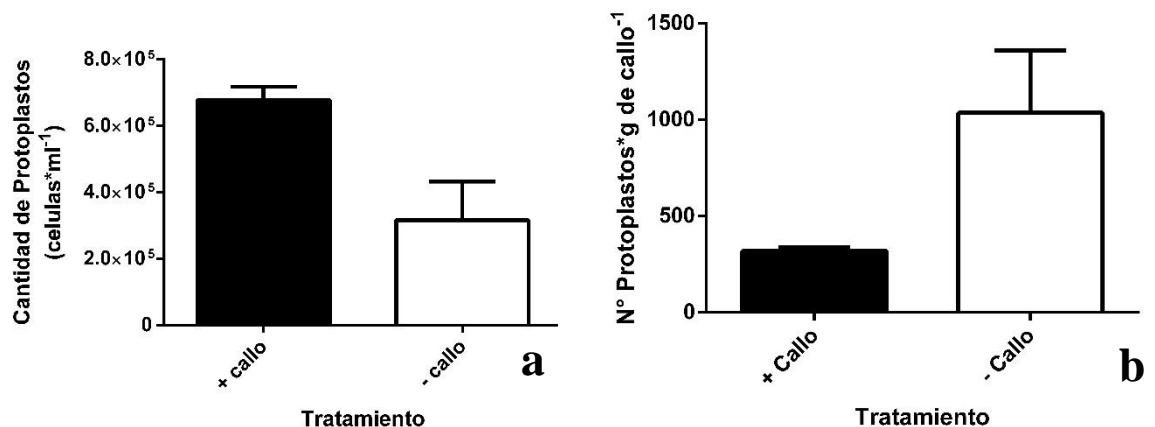


Figura 14. Cultivo de células en suspensión de callo visualizadas con microscopia en objetivo 40x. a) agregado de células de callos; b) Células de callo aisladas.

Luego de la digestión enzimática se obtuvieron protoplastos en ambas muestras, los



que fueron contados en el hemocitómetro. La cantidad de protoplastos contados para la muestra (+) callo fue de un promedio de $6,7 \times 10^5$ cél/ mL y para la muestra (-) callo fue de $3,1 \times 10^5$ cél/ mL (**Fig. 15, a**). Se correlacionaron los recuentos de protoplastos producidas según los gramos de callos, se pudo observar que mientras menor cantidad de gramos pesados se obtuvo una mayor cantidad de protoplastos (**Fig. 15, b**).

Figura 15. Protoplastos obtenidos en ambas muestras y correlación entre gramos y cantidad de protoplastos en un gráfico de eficiencia. a) Cantidad de protoplastos obtenidos en la muestra (+) callo y la muestra (-) callo; **b)** Gráfico de eficiencia en el que se comparó la cantidad de protoplastos producida según los gramos pesados en cada muestra.

Los protoplastos obtenidos presentaron una diferencia morfológica en comparación a las células de callos antes del tratamiento enzimático, adoptando formas esféricas de tamaños variables y no arriñonadas (**Fig. 16 a, b**).

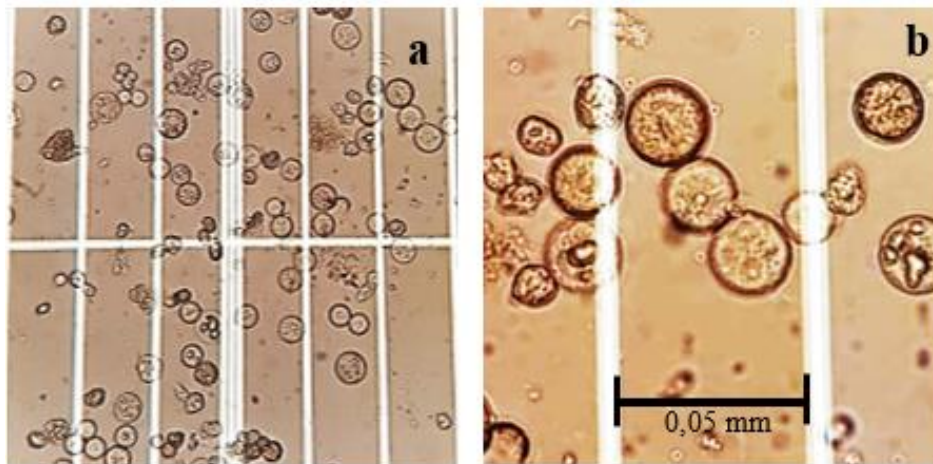


Figura 16. Microscopia de protoplastos de *D. carota* visualizados en objetivo 40x. a) Se observa un campo con abundantes protoplastos de distintos tamaños; **b)** Fotografía de tamaño aumentado en la cual se observan protoplastos en mayor detalle, destacan sus formas esféricas y la presencia de organelos visualizados en su interior.

Los protoplastos obtenidos fueron utilizados para los ensayos de electroporación e histoquímica de GUS, sin embargo, no se pudieron obtener resultados concluyentes, ya que al momento de visualizar a través de microscopia se observaron menos de 1 protoplasto por campo y los que sobrevivieron no presentaron expresión de GUS.

8. DISCUSIÓN

El proceso de embriogénesis a partir de semillas de *D. carota* ha resultado ser una manera óptima de obtener células aptas para cultivo en suspensión, a pesar de que el tiempo de formación de callos es extenso y conlleva subcultivos consecutivos lo que aumenta el riesgo de contaminación, como se pudo observar en este protocolo. Lo mencionado anteriormente concuerda con lo planteado por Brown (46), quien propone que el método de cultivo de callos es conveniente para mantener líneas celulares a largo plazo, y que los reguladores de crecimiento del medio nutritivo son esenciales para lograr este propósito.

Los explantes utilizados para la formación de callos correspondieron a segmentos intermedios entre epicotíleo e hipocotíleo los cuales fueron extraídos a través de cortes. Se pudo observar que en las zonas de corte en ambos extremos se empezaron a formar los callos, que se presentaron como formaciones protuberantes, lo que se explica por la acumulación de auxinas en los extremos cortados y el aumento de la mitosis en estas zonas lo que concuerda con el estudio de Rodríguez et al. (47) en el cual analiza el crecimiento de callos provenientes de hojas del arbusto *Ugni molinae* los cuales tuvieron un comportamiento similar al observado en este experimento frente a distintos estímulos hormonales.

En cuanto a los reguladores de crecimiento utilizados ya sean las auxinas ANA, 2,4-D o kinetinas, se pudo evidenciar que si cumplieron un rol fundamental en el crecimiento de los callos y la replicación celular en los cultivos líquidos.

En el caso del cultivo de callos, estos aumentaron su tamaño y volumen a medida que se subcultivaban y se mantenían a través del tiempo en medios sólidos nutritivos suplementados con la auxina sintética 2,4 -D, esto concuerda con lo planteado por Jain et al. (48), quienes en su estudio pudieron comprobar que los estímulos hormonales en callos cultivados *in vitro* produjeron un aumento en el crecimiento celular y acumulación de metabolitos secundarios con propiedades benéficas para las células en cultivo. Aun así, durante el proceso de embriogénesis no sobrevivieron todos los callos y muchos tendieron a secarse, lo que puede deberse a la deshidratación del medio de cultivo y a la variación en los cambios de temperatura ambiental, una condición que presentó limitantes durante el experimento.

Otra posible causa de la muerte de algunos callos pueden ser la misma fitohormona 2,4 - D añadida al medio de cultivo. Como se mencionó anteriormente esta es utilizada en la industria como un herbicida y estimula en gran manera la replicación celular, y a pesar de que en el presente estudio se utilizó en cantidades controladas y estandarizadas, es sabido que la estimulación de la división celular que provoca va de la mano con la producción y el aumento de radicales del oxígeno que son tóxicas para todo tipo de células.

En cuanto al recuento de células y la masa de callos pesada se encontró la correlación esperada en cuanto a proporción, el cultivo (+) callo presentó mayor cantidad de células en suspensión en comparación al medio (-) callo en el cual el inóculo inicial fue menor. Thorat et al. (49) proponen que el tamaño del inóculo inicial de callos es fundamental en un medio

en suspensión y se relaciona con la disponibilidad de nutrientes, los que serán el factor limitante del crecimiento celular durante el cultivo.

Al momento de observar microscópicamente la muestra de callos en suspensión se pudieron encontrar agregados celulares de mayor tamaño (**Fig. 13, a**). Se ha propuesto que la formación de estos tipos de agregado representa una dificultad en la captación de nutrientes por parte de la célula, la captación de oxígeno disminuye y se produce un estrés nutricional que se traduce en una limitación en el crecimiento y una menor sobrevida celular (2).

Debido a lo planteado anteriormente, la agitación de los contenedores durante el proceso de cultivo es fundamental para obtener células viables y aisladas ya que este proceso facilita la separación de las células luego de la división. En contraste a lo mencionado anteriormente Li y Kurata (50) plantean que si bien la agitación es un proceso fundamental, también podría representar un riesgo debido al daño por estrés hidrodinámico, lo que en el presente estudio fue controlado utilizando bajas revoluciones en el agitador, y se controló al observar a través de microscopia, en donde la cantidad de células lisadas que se observaron fue baja y no se consideró significativo.

Luego de la digestión enzimática, se pudo observar en el gráfico de eficiencia que se pudo recuperar una mayor cantidad de protoplastos de la muestra (-) callos que de la muestra con más callos pesados según los gramos, a pesar de que la muestra (+) callos tuviera más células en suspensión. Estos datos concuerdan con lo planteado en la literatura (2), y se destaca nuevamente la importancia de evitar los agregados celulares en los

cultivos, debido a que estos agregados dificultan no solo la viabilidad de las células, también dificultan la digestión enzimática y la formación de protoplastos.

John et al. (51) plantean que el uso de pectinasas (enzimas capaces de degradar polisacáridos pectinos de la pared celular) en los cultivos, es un método efectivo para producir la separación de las células, sin degradar completamente la pared celular y formar protoplastos. Lo anterior no se pudo llevar a cabo en este estudio, por lo que esta variable solo se pudo controlar a través de la agitación mecánica, con lo que se pudo evidenciar que no es suficiente para controlar la agregación celular.

Los resultados obtenidos del ensayo de electroporación e inmunoensayo de GUS no fueron concluyentes, al finalizar el proceso de electroporación e incubación de los protoplastos se pudo observar una mínima cantidad (menos de 1 protoplasto por campo), los que luego de tratarlos con la técnica de inmunoensayo se lisaron en su mayoría y no se evidenció expresión GUS. Esto contrasta con lo descrito por Bower y Birch (52), quienes en su estudio de electroporación de células de *D. carota* en suspensión lograron obtener protoplastos que expresaron GUS en todas las réplicas realizadas y en condiciones similares a las del presente estudio.

Una de las posibles fuentes de error en el proceso de electroporación puede deberse a la mantención de las condiciones ideales de los protoplastos. Se sabe que estas células son susceptibles a cambios en las condiciones del medio, principalmente la osmolaridad que dependerá de la composición y la concentración de los nutrientes (31). Durante el proceso de electroporación los protoplastos debieron ser expuestos a un buffer distinto en cuanto a

su composición y pH (buffer de electroporación), en comparación al medio W5 en el cual se mantenían anteriormente, el cual es utilizado para mantener los protoplastos en condiciones óptimas por un periodo de tiempo mayor.

9. CONCLUSIÓN

El cultivo *in vitro* de semillas de zanahoria (*D. carota*), en medio solido nutritivo y suplementado con fitohormonas, es un método útil para obtener callos y posteriormente células indiferenciadas en cultivos en suspensión.

La digestión enzimática de células de callo en suspensión a través de enzimas hidrolíticas fúngicas es una técnica útil para obtener protoplastos aislados, principalmente en cultivos en que se presentan menor cantidad de agregados celulares.

Los protoplastos utilizados durante el experimento, no resultaron viables para su uso en transfección genética a través de la técnica de electroporación.

Controlar de manera óptima las variables involucradas en la obtención de protoplastos y la electroporación es un punto crítico para obtener resultados positivos y confiables.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Abdelnour A VJ. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales.: CATIE; 1994.
2. García A. Inducción y cultivo de células en suspensión de *Daucus carota*. La Laguna: 2016.
3. Fernández A, Ballesteros M, Ugedo L. Biología, los genes y la ingeniería genética. Madrid: Santillana; 2000. p. 178 - 93.
4. Sánchez L, Alvarenga S. Calogénesis y establecimiento del cultivo de células en suspensión de *Uncaria tomentosa* (Wild.) D.C. (uña de gato). *Tecnología en Marcha*. 2015;28(1).
5. Plant mineral nutrients. Methods and protocols. In: Maathuis F, editor. *Plant cells suspension culture*. York: Human Press; 2013. p. 77 - 93.
6. Recent advances in plant in vitro culture. In: Annarita L, editor. *Plant tissue culture media*. Libya: IVALSA; 2012. p. 29 - 40.
7. Reynaud A. Requerimiento de micronutrientes y oligoelementos. *Revista peruana de ginecología y obstetricia*. 2014;60(2):161 - 70.
8. Merchant SS. The elements of plant micronutrients. *Plant Physiology*. 2010;154(2):512-5. Epub 10/06.
9. Avigad G, Dey P. Carbohydrate metabolism: storage carbohydrates. In: Dey P, Harborne J, editors. *Plant Biochemistry*. Great Britain: Elsevier; 1997. p. 143 - 203.
10. The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. In: George EH, Michael, editor. *Plant propagation by tissue culture: volume 1 The background*: Springer; 2007. p. 115 - 73.
11. Barz W. Metabolism and Degradation of Nicotinic Acid in Plant Cell Cultures. K N, W B, E R, editors. Berlin, Heidelberg: Springer; 1985.
12. Chen H, Xiong L. Pyridoxine is required for post - embryonic root development and tolerance to osmotic and oxidative stresses. *The Plant Journal*. 2005;44(3):396 - 408.
13. Le Bris M. Hormones in growth and development. France: Elsevier, 2017.
14. Feng J, Shi Y, Yang S, Zuo J. Cytokinins. In: Jones G, editor. *Hormone metabolism and signaling in plants*. Beijing, China: Elsevier; 2017. p. 78 - 106.
15. J Bonner a, Bandurski RS. Studies of the Physiology, Pharmacology, and Biochemistry of the Auxins. *Annual Review of Plant Physiology*. 1952;3(1):59-86.
16. Paque S, Weijers D. Q&A: Auxin: the plant molecule that influences almost anything. *BMC Biology*. 2016;14(1):67-.
17. Yunde Z. Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu Rev Plant Biol*. 2010;61:49 - 64.
18. Perrot-Rechenmann C. Cellular responses to auxin: division versus expansion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2010;2(5):a001446-a.

19. Krieger R. Handbook of Pesticide Toxicology: Principles and Agents: Elsevier Science; 2001.
20. Burns CJ, Swaen GM. Review of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) biomonitoring and epidemiology. *Critical Reviews in Toxicology*. 2012;42(9):768-86. Epub 2012/08/11.
21. Tayeb W, Chaieb I, Hammami M. Environmental fate and effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic herbicide 2011. 161-87 p.
22. Aizawa H. Metabolic Maps of Pesticides: Elsevier Science; 2012.
23. Davidonis GH, Hamilton RH, Mumma RO. Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid in 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid-resistant soybean callus tissue. *Plant Physiology*. 1982;70(1):104-7.
24. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 1962;15:473 - 9.
25. Petersen M, Alfermann W. Plant cell cultures. In: Sahn H, editor. *Biotechnology*, 2 edition. Weinheim: VCH; 1993. p. 577 - 615.
26. Lallana V, Lallana M. Manual de Prácticas de Fisiología Vegetal. 2003:70 - 80.
27. Raven P, Evert R, Eichhorn S. Sección 6: Regulación y respuestas del crecimiento. *Biología de las plantas*, volumen 2: Reverte; 1992. p. 473 - 93.
28. Szabados L, Mroginski L, Roca W. suspensiones celulares: descripción, manipulación y aplicaciones. *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. Cali, Colombia: CIAT; 1991. p. 173 - 95.
29. Mustafá N, Winter W, Iren F, Verpoorte R. Initiation, growth and cryopreservation of plant cell. 2011;6(6):715 - 42.
30. Keegstra K. Plant cell walls. *Plant Physiology*. 2010;154(2):483-6. Epub 10/06.
31. Garcia V. Introducción a la microbiología 2º Edición ed: Euned.
32. Cubero JI. Introducción a la mejora genética vegetal: Mundi-Prensa Libros, S.A.; 2013.
33. Alvarez TM, Paiva JH, Ruiz DM, Cairo JP, Pereira IO, Paixão DA, et al. Structure and function of a novel cellulase 5 from sugarcane soil metagenome. *PLoS One*. 2013;8(12):e83635. Epub 2013/12/21.
34. Kassim E-SA. Cellulase Enzyme from *Aspergillus niger*. *Microbiology and Immunology*. 1982;26(6):449-54.
35. Ortega-Heras M, Pérez-Magariño S, González-Sanjosé ML. Comparative study of the use of maceration enzymes and cold pre-fermentative maceration on phenolic and anthocyanic composition and colour of a Mencía red wine. *LWT - Food Science and Technology*. 2012;48(1):1-8.
36. Yoshida S, Tsuyumu S, Tsukiboshi T. Macerating Enzymes Produced by *Rhizopus oryzae* in Infected Mulberry Roots 2003. 436-41 p.
37. Tamaru Y, Ui S, Murashima K, Kosugi A, Chan H, Doi RH, et al. Formation of protoplasts from cultured tobacco cells and *Arabidopsis thaliana* by the action of cellulosomes and pectate lyase from *Clostridium cellulovorans*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002;68(5):2614-8.
38. Tsong TY. Electroporation of cell membranes. *Biophysical Journal*. 1991;60(2):297-306.
39. Potter H. Transfection by electroporation. *Current Protocols in Molecular Biology*. 2003;Chapter 9:Unit-9.3.

40. Carter M, Shieh J. Chapter 11 - Gene Delivery Strategies. In: Carter M, Shieh J, editors. Guide to Research Techniques in Neuroscience (Second Edition). San Diego: Academic Press; 2015. p. 239-52.
41. Jefferson RA. The GUS reporter gene system. *Nature*. 1989;342:837.
42. Miles JW, do Valle CB. 'Brachiaria' : biología, agronomía y mejoramiento: Centro Internacional de Agricultura Tropical; 1998.
43. A Hull G, Devic M. The beta-glucuronidase (gus) reporter gene system. Gene fusions; spectrophotometric, fluorometric, and histochemical detection 1995. 125-41 p.
44. Negrutiu I, Jacobs M. Factors which Enhance *in vitro* Morphogenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*. 1978;90(5):423-30.
45. Fromm M, Taylor LP, Walbot V. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985;82(17):5824-8.
46. Brown JT. The Initiation and Maintenance of Callus Cultures. In: Pollard JW, Walker JM, editors. *Plant Cell and Tissue Culture*. Totowa, NJ: Humana Press; 1990. p. 57-63.
47. Rodríguez MM, Latsague Vidal MI, Chacón MA, Astorga PK. Inducción *in vitro* de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*. *Bosque (Valdivia)*. 2014;35:111-8.
48. Jain S, Pancholi B, Jain R. *In vitro* Callus Propagation and Secondary Metabolite Quantification in *Sericostoma pauciflorum*. *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR*. 2012;11(4):1103-9.
49. Thorat AS, Sonone NA, Choudhari VV, Devarumath RM, Babu KH. Plant regeneration from cell suspension culture in *Saccharum officinarum* L. and ascertaining of genetic fidelity through RAPD and ISSR markers. *3 Biotech*. 2017;7(1):16-. Epub 04/08.
50. Li H, Kurata K. Static suspension culture of carrot somatic embryos. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2005;99(3):300-2.
51. John KM, Nagella P, Thiruvengadam M, Azad Mandal A. Enhancement of the productivity of tea (*Camellia sinensis*) secondary metabolites in cell suspension cultures using pathway inducers. *Journal of Crop Science and Biotechnology*. 2013; 16(2):143-149.
52. Bower R, Birch RG. Competence for gene transfer by electroporation in a sub-population of protoplasts from uniform carrot cell suspension cultures. *Plant Cell Reports*. 1990;9(7):386-9.