

Inducción y cultivo de células en suspensión
de *Daucus carota*.

Induction and culture of suspension cells of
Daucus carota.



Universidad de La Laguna.

Facultad de Ciencias.

Sección de Biología.

Abrahán García Borges.

Grado en Biología.

Septiembre 2016.

SOLICITUD DE DEFENSA Y EVALUACIÓN TRABAJO FIN DE GRADO Curso Académico: 2015 / 2016	ENTRADA Fecha: Núm:
----------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------

Datos Personales

Nº DNI o pasaporte: 78646029 J	Nombre y Apellidos: Abrahán García Borges
Teléfono: 625 216 280	Dirección de correo electrónico: abrahamgb13@gmail.com

SOLICITA la defensa y evaluación del Trabajo Fin de Grado

TÍTULO

Inducción y cultivo de células en suspensión de <i>Daucus carota</i> .

Autorización para su depósito, defensa y evaluación

D./Dña. JUAN FELIPE PÉREZ FRANCÉS	
Profesor/a del Departamento de Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal	
y D./Dña.	
Profesor/a del Departamento de	
autorizan al solicitante a presentar la Memoria del Trabajo Fin de Grado	
Fdo.: <u>JUAN FELIPE PÉREZ FRANCÉS</u>	Fdo.:

La Laguna, a 27 de julio de 2016

Firma del interesado/a



SR/A. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE GRADO DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA

Documentación a adjuntar:

- Un ejemplar en formato electrónico de la Memoria conforme a las normas de presentación establecidas en el Anexo I del Reglamento para la elaboración y defensa del TFG.
- Informe-evaluación de los tutores en sobre cerrado y firmado.

Ejemplar para la Secretaría

SOLICITUD DE DEFENSA Y EVALUACIÓN TRABAJO FIN DE GRADO Curso Académico: 2015 / 2016	ENTRADA Fecha: Núm:
----------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------

Datos Personales

Nº DNI o pasaporte: 78646029 J	Nombre y Apellidos: Abrahán García Borges
Teléfono: 625 216 280	Dirección de correo electrónico: abrahamgb13@gmail.com

SOLICITA la defensa y evaluación del Trabajo Fin de Grado

TÍTULO

Inducción y cultivo de células en suspensión de <i>Daucus carota</i> .

Autorización para su depósito, defensa y evaluación

D./Dña. JUAN FELIPE PÉREZ FRANCÉS	
Profesor/a del Departamento de Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal	
y D./Dña.	
Profesor/a del Departamento de	
autorizan al solicitante a presentar la Memoria del Trabajo Fin de Grado	
Fdo.: JUAN FELIPE PÉREZ FRANCÉS	Fdo.:

La Laguna, a 27 de julio de 2016

Firma del interesado/a



SR/A. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE GRADO DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA

Documentación a adjuntar:

- Un ejemplar en formato electrónico de la Memoria conforme a las normas de presentación establecidas en el Anexo I del Reglamento para la elaboración y defensa del TFG.
- Informe-evaluación favorable de los tutores en sobre cerrado y firmado.

Ejemplar para el interesado/a

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. EVOLUCIÓN HISTÓRICA DEL CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE PLANTAS.....	1
1.2. IMPORTANCIA MUNDIAL DEL CULTIVO DE ZANAHORIA.	2
1.3. CULTIVO <i>IN VITRO</i>	3
2. OBJETIVOS.....	5
3. MATERIAL Y MÉTODOS.	5
3.1. MATERIAL VEGETAL.....	5
3.2. MEDIO DE CULTIVO.	6
3.2.1 PREPARACIÓN DE REGULADORES DE CRECIMIENTO.	8
3.2.2. MEDIO DE CULTIVO PARA EXPLANTOS DE CALLO.....	8
3.2.3. MEDIO DE CULTIVO PARA CÉLULAS EN SUSPENSIÓN.	8
3.3. CULTIVO <i>IN VITRO</i>	9
3.4. CONTROL DE LA EVOLUCIÓN DE LOS EXPLANTOS.	10
3.5. CONTEO CELULAR CON HEMATOCITÓMETRO.....	11
3.6. TINCIÓN CON AZUL DE METILENO.....	13
3.7. ESTUDIO ESTADÍSTICO.	13
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
4.1. CONTEO CÉLULAR.	14
4.2. ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DE CÉLULAS.....	17
4.4 OBSERVACIONES EN MICROSCOPIO DE CÉLULAS Y AGREGADOS.....	21
5. CONCLUSIONES.....	25
6. BIBLIOGRAFÍA.....	25

RESUMEN.

Los cultivos de células vegetales en suspensión nos permiten estudiar la fisiología y la producción de metabolitos secundarios *in vitro* de las células vegetales. En este trabajo se evalúa las respuestas que presentan las células vegetales creciendo en medios de cultivo MS suplementados con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento. Se llevaron a cabo dos tratamientos hormonales diferentes, presentando ambos diferencias entre sí. Tras realizar conteos celulares utilizando la técnica del hematocitómetro, se concluyó que el mejor medio para estudiar el crecimiento celular fue Murashige & Skoog suplementado con 1 mg/l de 2,4-D. Además, ambos medios forman agregados celulares, una característica típica de los cultivos de células vegetales en suspensión. Se recomienda, utilizar algún método que permita disgregar los grupos celulares en células individuales o en agregados de no más de 10 células. A partir del tercer día de cultivo, se observa un crecimiento exponencial que continúa hasta el día 14. Mientras que a partir del día 14, las células entran en una fase estacionaria debido, con toda probabilidad al agotamiento de los nutrientes en el medio de cultivo.

PALABRAS CLAVE: agregados celulares, cultivo *in vitro*, medio de cultivo, cultivo de células en suspensión, zanahoria, *Daucus carota*.

ABSTRACT

The plant cell cultures in suspension allow us to study the physiology and production of secondary metabolites by plant cells. This paper presents the responses of plant cells growing in culture media MS supplemented with different concentrations of growth regulators. They were carried out two different hormonal treatments, presenting both differences between them. After performing cell counts using hemacytometer technique, it was concluded that the best way cell growth was Murashige & Skoog supplemented with 1 mg/l of 2,4-D. Furthermore, both media produced cell aggregates, a typical characteristic of plant cell cultures in suspension. It is recommended to use some method to disaggregate the cell groups in individual cells or aggregates of no more than 10 cells. From the third day of culture, was observed an exponential growth that continues until day 14. While from day 14, the cells enter a stationary phase because in all likelihood the depletion of nutrients in the culture medium.

KEY WORD: cell aggregates, culture medium, *in vitro* culture, cell suspension culture, carrot, *Daucus carota*.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. EVOLUCIÓN HISTÓRICA DEL CULTIVO *IN VITRO* DE PLANTAS.

En investigaciones desarrolladas sobre el tema de diferenciación celular, Gottlieb Haberlandt en 1898 aisló células y tejidos de plantas superiores y las colocó en soluciones nutritivas para su crecimiento y estudio, dando origen de esta manera a la técnica de cultivo de células y tejidos vegetales. Así, Haberlandt fue el pionero en el cultivo *in vitro* de células vegetales completamente diferenciadas, habiendo reportado sus estudios y resultados en 1902, según lo indican Krikorian y Berquam (1969). Haberlandt propuso que era posible cultivar juntas células vegetativas libres y tubos polínicos adicionando soluciones nutrientes suplementadas con extractos de ápices vegetativos o con fluidos de sacos embrionarios. Es por ello que ahora se considera a Haberlandt como el padre de la técnica de cultivo de células y tejidos vegetales, la cual se ha convertido en el dogma central de la Biotecnología Vegetal.

Después de Haberlandt, no fue sino hasta el año 1939 que se consiguieron los primeros cultivos exitosos de callos inducidos experimentalmente casi al mismo tiempo en los laboratorios de investigación de Gautheret en París, Nobécourt en Grenoble, y White en Princeton. Estos cultivos se derivaron originalmente a partir de explantes de la zanahoria y el tabaco. En ese tiempo hubo dos grandes descubrimientos que repercutieron de manera fundamental sobre el desarrollo de la técnica de cultivo de células y tejidos vegetales: primero, la identificación de las auxinas como reguladoras naturales del crecimiento vegetal, y segundo, el reconocimiento de la importancia de las vitaminas del complejo B en el crecimiento de las plantas.

En 1934, Gautheret cultivó células de cambium de algunas especies en una solución mineral con glucosa y cloruro de cisteína. Encontró que dichas células proliferaban por algunos meses y que adicionando vitaminas y ácido indolacético (AIA) se estimulaba considerablemente su crecimiento. Más tarde, en 1939 White reportó el establecimiento de cultivos similares pero a partir de tejidos tumorales de un híbrido de *Nicotiana glauca* X *N. langsdorffii*. Estos investigadores junto con Nobecourt, quien reportó en ese mismo año el establecimiento de un cultivo similar a partir de zanahoria, son los tres investigadores considerados los pioneros de la técnica del cultivo de células y tejidos vegetales (Bhojwani y Razdan 1983, Street 1977).

El cultivo *in vitro* ha permitido avances considerables en el estudio de tumores, que en parte, han hecho posible la realización de las primeras pruebas de manipulación genética en nuestros días.

Después de la Segunda Guerra Mundial (1945) el desarrollo en este campo ha sido especialmente rápido y se han publicado numerosos resultados interesantes para la agricultura, silvicultura y horticultura (Pierik, 1979; Bhojwani *et al*, 1986).

El descubrimiento de los reguladores de crecimiento ofreció grandes oportunidades para el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. El primer regulador descubierto fue la auxina IAA (ácido 3-indolacético), pero los grandes avances vinieron con el descubrimiento en 1955 de la sustancia reguladora kinetina (una citoquinina). A continuación, se mencionan algunas fechas y hechos importantes:

- 1902: Primeros intentos de Haberlandt, quien inicia sus primeras investigaciones en 1898, publicándolas posteriormente en 1902.
- 1922: Se realizó con éxito el primer cultivo de ápices de raíces de maíz (J. Robbin).
- 1934: Obtención de un cultivo de raíces de tomate creciendo activamente en un medio nutritivo por tiempo limitado (White).
- 1939: Primeros cultivos de callos creciendo indefinidamente (Gautheret).
- 1953: Primeros cultivos de células en suspensión (Muir *et al.*).
- 1954: Obtención de divisiones celulares a partir de una célula mediante su contacto con un tejido nodriza separado de la célula por un papel de filtro (Muir *et al.*).
- 1955: Descubrimiento de la Kinetina, una hormona de la división celular (Miller *et al.*).
- 1957: Descubrimiento de la regulación de la formación de órganos (raíces y vástagos), variando la proporción citoquinina/auxina (Skoog y Miller).
- 1958 y 1959: Embriogénesis de zanahoria y suspensiones en biorreactor (Murashige y Skoog).
- 1960: Cultivo de protoplastos a gran escala (Cocking).
- 1962: Desarrollo por Murashige y Skoog del medio de cultivo más utilizado.
- 1965: Obtención de la primera planta a partir de una célula aislada, demostrando así la totipotencia de las células vegetales (Vasil y Hildebrandt).
- 1974: Descubrimiento del plásmido-Ti, principal inductor de tumores de *Agrobacterium* y primer paso hacia la ingeniería genética (Zaenen *et al.*; Larebeke *et al.*).

1.2. IMPORTANCIA MUNDIAL DEL CULTIVO DE ZANAHORIA.

La familia Apiaceae es una de las mayores familias de angiospermas que comprende 300 géneros y 2.500-3.000 especies. Los miembros de estas familias se pueden encontrar en el norte de las regiones templadas y tropicales situados en tierras altas alrededor del mundo. Esta

familia se caracteriza por su distintiva inflorescencia en forma de paraguas, la umbela. La Zanahoria (*Daucus carota*) es un miembro importante de la familia Apiaceae, que fue bien conocido por los griegos y romanos con fines medicinales (Kochhar, 1998). La zanahoria es un cultivo de estación fría, crece bien en un suelo profundo, húmedo, suelto y bien drenado. Se cultiva entre 1.200-2.700 metros de altitud.

El cultivo de la zanahoria ha experimentado un importante crecimiento en los últimos años, tanto en superficie, como en producción, ya que se trata de una de las hortalizas más producidas en el mundo. Asia es el mayor productor seguida por Europa y E.E.U.U.

Las cualidades nutritivas de las zanahorias son importantes, especialmente por su elevado contenido en beta-caroteno (precursor de la vitamina A), pues cada molécula de caroteno que se consume es convertida en dos moléculas de vitamina A. En general se caracteriza por un elevado contenido en agua y bajo contenido en lípidos y proteínas.

1.3. CULTIVO *IN VITRO*.

El cultivo *in vitro* de plantas puede definirse como el cultivo de células, tejidos, órganos, embriones y plantas enteras, en condiciones asépticas, dentro de recipientes adecuados conteniendo un medio nutritivo y en un ambiente controlado, cuyo objetivo es la formación y producción de células o productos deseados.

Un callo consiste en una masa amorfa de células de parénquima de paredes finas libremente dispuestas que provienen de células en proliferación del tejido matriz. Con frecuencia, como resultado de la herida, se forma un callo en el extremo cortado de un tallo o raíz. Aunque el principal énfasis ha estado en los tejidos de angiospermas, la formación del callo se ha observado en gimnospermas, helechos, musgos y hepáticas (Yeoman, 1970; Yeoman y Macleod, 1977).

Sinnott (1960) ha descrito algunas de las primeras observaciones sobre la formación del callo. Los estímulos implicados en la iniciación de callo de la herida son las hormonas endógenas auxina y citoquinina. Además de la lesión mecánica, el callo se puede producir en los tejidos vegetales después de una invasión por ciertos microorganismos (Braun, 1954) o por alimentación de los insectos (Pelet et al., 1960). En 1939 se consiguieron los primeros cultivos exitosos de callos inducidos experimentalmente casi al mismo tiempo en los laboratorios de investigación de Gautheret en París, Nobécourt en Grenoble, y White en Princeton. Estos cultivos se derivaron originalmente a partir de explantes de la zanahoria y el tabaco. El término "cultivo de tejidos", tal como se aplica a este tipo de cultivos, es un término equivocado.

La característica más importante del callo, desde un punto de vista funcional, es que este crecimiento anormal tiene el potencial de desarrollar raíces, brotes, y embrioides que pueden formar plantas. Las características de crecimiento generales de un callo implican una relación compleja entre el material vegetal utilizado para iniciar el callo, la composición del medio y las condiciones ambientales durante el período de incubación. El establecimiento de un callo a partir de un explante se puede dividir a grandes rasgos en tres etapas de desarrollo: inducción, división celular y diferenciación. Durante la fase inicial de inducción el metabolismo es estimulado para que las células se preparen para la división. La duración de esta fase depende principalmente de la condición fisiológica de las células del explante, así como las condiciones del cultivo. Posteriormente, hay una fase de la división celular activa en el que las células de los explantes vuelven a un estado meristemático o de "desdiferenciación". Una tercera fase consiste en la aparición de la diferenciación celular y la expresión de ciertas rutas metabólicas que conducen a la formación de productos secundarios.

Los cultivos de callos tienen que ser subcultivados cada 3-5 semanas para mantener su viabilidad al renovar el medio de cultivo antes del agotamiento de los nutrientes. Por lo tanto, los callos son fáciles de mantener y son los más ampliamente utilizados.

El callo prolifera como una masa desorganizada de células, así que es muy difícil de seguir muchos eventos celulares durante su crecimiento y fases de desarrollo. Para superar estas limitaciones del cultivo de callos, se inició el cultivo de células libres, así como los agregados de células pequeñas en un medio líquido definido químicamente como una suspensión para estudiar los cambios morfológicos y bioquímicos durante su crecimiento y fases de desarrollo. El cultivo en suspensión elimina muchos de los inconvenientes atribuidos al cultivo de callo sobre medio de agar. El movimiento de las células en relación con los nutrientes del medio facilita el intercambio gaseoso, elimina cualquier polaridad de las células debido a la gravedad y elimina los gradientes de nutrientes en el medio y en la superficie de las células.

Según King (1980) el término "cultivo en suspensión" no tiene una definición biológica clara, y estos sistemas de cultivo de tejidos son, evidentemente, más que simplemente agregados de células suspendidas en un medio líquido. Los cultivos de células en suspensión generalmente se inician mediante la transferencia de fragmentos de callo indiferenciado a un medio líquido, el cual se agita durante el período de cultivo. Después de un corto periodo de tiempo el cultivo se compone de células aisladas, agregados celulares de varios tamaños, residuos del inóculo y restos de células muertas. El término en inglés "friable" se utiliza para describir la separación

de células después de la división celular. La formación de una "buena suspensión" (es decir, un cultivo que consiste en un alto porcentaje de células individuales y pequeños grupos de células) es mucho más compleja que la búsqueda de las condiciones ambientales óptimas para la separación de células (King, 1980). El grado de separación de células de los cultivos ya establecidos que tienen las características de alta disgregabilidad se puede modificar cambiando la composición de los nutrientes del medio. Por otra parte, algunos cultivos exhiben una baja disgregabilidad independientemente de las condiciones de cultivo (King y Street, 1977). No existe un procedimiento estándar para iniciar cultivos en suspensión de células procedentes de callos; la elección de las condiciones adecuadas se determina en gran parte por ensayo y error (King y Street, 1977). El inicio de un cultivo en suspensión de células requiere una cantidad relativamente grande de callo para servir como el inóculo. Cuando el material de la planta se coloca primero en el medio, hay un período de retraso inicial antes de cualquier signo de división celular. Esto es seguido por un aumento exponencial en el número de células, y un aumento lineal en la población celular. Hay una desaceleración gradual de la tasa de división. Finalmente, las células entran en una etapa no divisoria o estacionaria. Con el fin de mantener la viabilidad del cultivo, las células deben ser subcultivadas durante esta fase estacionaria.

2. OBJETIVOS.

El objetivo general de este trabajo es la inducción y cultivo de células en suspensión de *Daucus carota*.

En concreto, este estudio tiene como objetivos particulares:

- Observar y monitonzar la evolución del cultivo en medio líquido.
- Identificar el medio de cultivo más adecuado para la proliferación de células de *Daucus carota*.

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. MATERIAL VEGETAL.

El material de partida utilizado fueron callos de zanahoria (*Daucus carota*), los cuales fueron elegidos según su estado desarrollo, de callos que habían sido inducidos en las prácticas de biotecnología vegetal, de la asignatura Aplicaciones de la Fisiología Vegetal.

Tras la toma de los callos, se procedió a subcultivar dichos callos en medios nuevos para aumentar así la proliferación de estos.

3.2. MEDIO DE CULTIVO.

Para el cultivo *in vitro* se utilizó el medio de cultivo MS (Murashige and Skoog, 1962). El cual está compuesto como se muestra en la figura 1.

MURASHIGE & SKOOG MEDIUM basal salt mixture and vitamins

CaCl ₂	332.02	mg/l	2.99	mM
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025		0.11	μM
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025		0.10	μM
FeNaEDTA	36.70		0.10	mM
H ₃ BO ₃	6.20		0.10	mM
KH ₂ PO ₄	170.00		1.25	mM
KI	0.83		5.00	μM
KNO ₃	1900.00		18.79	mM
MgSO ₄ .7H ₂ O	370.00		1.50	mM
MnSO ₄ .H ₂ O	16.90		0.10	mM
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25		1.03	μM
NH ₄ NO ₃	1650.00		20.61	mM
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60		29.91	μM
glycine	2.00		26.64	μM
<i>myo</i> -inositol	100.00		0.56	mM
nicotinic acid	0.50		4.06	μM
pyridoxin HCl	0.50		2.43	μM
thiamine HCl	0.10		0.30	μM
	4594.65	mg/l		

Murashige T. and Skoog F.
Physiol. Plant, 15, 473 (1962)

Figura 1. Tabla del medio de cultivo MS (Murashige and Skoog, 1962).

El procedimiento utilizado para la preparación de nuestro medio de cultivo consistió en la fabricación de las soluciones madre que contenían las sales minerales y los componentes orgánicos cuya composición se describe en la tabla 1.

Para la preparación de 1 litro de medio, se añadieron en un Erlenmeyer 100ml de Macro I, 100ml de Macro II, 10ml de Micro I, 10ml de Micro II, 10ml de Vitaminas y aminoácidos, 100mg de Mesoinositol, 30g de sacarosa.

MACRONUTRIENTES I		
REACTIVO		CANTIDAD (g/l)
Nitrato de Amonio	NH_4NO_3	16,5
Nitrato de Potasio	KNO_3	19,0
Sulfato de Magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,7
Fosfato de Potasio	KH_2PO_4	1,7

MACRONUTRIENTES II		
REACTIVO		CANTIDAD (g/l)
Cloruro de Calcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,4

MICRONUTRIENTES I		
REACTIVO		CANTIDAD (mg/l)
Ácido Bórico	H_3BO_3	620
Yoduro de Potasio	KI	83
Sulfato de Manganeso	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2230
Sulfato de Zinc	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	860
Molibdato de Sodio	$\text{MoO}_4\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25
Sulfato de Cobre	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,5
Cloruro de Cobalto	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,5

MICRONUTRIENTES II		
REACTIVO		CANTIDAD (mg/l)
Etilendiaminatetracético	EDTA-Na_2	3730
Sulfato ferroso	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2780

VITAMINAS Y AMINO ÁCIDOS	
REACTIVO	CANTIDAD (mg/l)
Ácido nicotínico	50
Tiamino	10
Piridoxina	50
Glicina	200

Tabla 1. Composición del medio utilizado.

3.2.1 PREPARACIÓN DE REGULADORES DE CRECIMIENTO.

Se utilizó la auxina ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y la citoquinina bencialaminopurina (BA). Para la preparación de 100ml se procedió de la siguiente forma:

- Para 2,4-D: se pesaron 0,1 g de 2,4-D, se disolvieron en 5 ml de KOH al 1%, seguidamente, se añadió agua destilada y se seguía mezclando. Por último se enrazaba con agua destilada hasta los 100 ml.
- Para BA: se pesaron 0,1 g de BA, al que se le añadieron 5 ml de KOH 0,3 N y se enrazó con agua destilada hasta los 100 ml.

En ambos casos se obtuvo una concentración de 1mg/ml.

3.2.2. MEDIO DE CULTIVO PARA EXPLANTOS DE CALLO.

Se utilizó el medio MS descrito en el apartado 3.2. Esta mezcla, se disolvió por agitación manual hasta la disolución de la sacarosa y el mesoinositol. Una vez disueltas, en otro Erlenmeyer se colocó 250ml de agua destilada y 9g (0,9%) de agar, los cuales fueron calentados en el microondas hasta conseguir la disolución del agar. Tras conseguir esto, se vertía en este Erlenmeyer el contenido del primero, se añadía 1 mg del regulador 2,4-D y se enrazaba hasta 1 litro. Por último, se ajustaba a un pH de 5,7.

Tras ello, el medio MS se repartía en frascos de vidrio una medida aproximada de 40 ml por bote, se tapaban y se introducían en el autoclave para esterilizar a 120°C, 1 Kg cm⁻² s⁻¹ durante 24 minutos. Transcurrido el tiempo de esterilización, se dejaban los botes en la cámara de siembra con luz ultravioleta hasta que el medio solidificara y pudiera ser utilizado.

3.2.3. MEDIO DE CULTIVO PARA CÉLULAS EN SUSPENSIÓN.

Para este ensayo, al medio de cultivo MS descrito en el apartado 3.2. se le añadieron los mismos componentes que para el medio de cultivo de explantos de callo en el apartado 3.2.2., eliminando únicamente el agar. Además de un tratamiento hormonal adicional, que consistía en 2mg/ml de 2,4-D y 1mg/ml de BA.

En este caso, se utilizaron en primer lugar Erlenmeyer de boca ancha de 100ml y posteriormente 250ml de boca ancha. En los cuales, se añadía en cada Erlenmeyers 20ml y 40 ml de medio respectivamente.

Posteriormente, se introducían en el autoclave para esterilizar en las mismas condiciones que en el apartado 3.2.2. y se dejaban en la cámara de siembra con luz ultravioleta hasta el momento de la siembra.

	Protocolo 1	Protocolo 2
2,4-D (mg/ml)	1	2
BA (mg/ml)	0,0	0,5

Tabla 2. Reguladores de crecimiento empleados en los cultivos.

3.3. CULTIVO *IN VITRO*.

Los explantos se manipularon en una cabina de flujo laminar estéril. Con la ayuda de pinzas, bisturí previamente esterilizado, en el esterilizador con bolas de cuarzo, y placas de Petri de cristal previamente esterilizadas en autoclave, se procedió como se explica a continuación:

- Cultivo de callos.

Con la ayuda de unas pinzas se depositaron los callos de zanahoria desde los medios de cultivos antiguos a una placa de Petri. Se eliminaron con la ayuda del bisturí las partes dañadas. Seguidamente se realizaron cortes con el fin de obtener porciones de aproximadamente 1cm de diámetro. Finalmente, se depositó un callo por bote que ya contenía el medio de cultivo, se taparon y se colocaron en la cámara de incubación para su crecimiento.

- Cultivo de células en suspensión.

Con la ayuda de unas pinzas se depositaron los callos en la placa de Petri, posteriormente se cortaron en fragmentos de pequeño tamaño de aproximadamente 0,5cm de diámetro, se introdujeron de tres a cuatro fragmentos en el medio de cultivo líquido, se tapó el Erlenmeyer con papel de aluminio y se protegió con parafilm. Finalmente se llevaron a la cámara de incubación y colocaron en un agitador cuya potencia oscilaba entre las 80-90 vueltas por minuto.

Además se llevaron a cabo varios subcultivos del material obtenido en el medio líquido. Para ello, se introdujo en un Erlenmeyer vacío y previamente esterilizado en autoclave, distintos cultivos, los cuales se tamizaban para eliminar los posibles agregados de mayor tamaño y se dejaba reposar unos 5 minutos. Luego, en un medio líquido nuevo se añadían 20ml de esta concentración y se incubaban.

3.4. CONTROL DE LA EVOLUCIÓN DE LOS EXPLANTOS.

Tras el cultivo, se realizaron observaciones cada 3 días con el fin de eliminar aquellos recipientes contaminados y estudiar los cambios que se producían.



Figura 2. Material contaminado. A) Callos en medio sólido contaminados. B) Cultivo de células en suspensión contaminado.

3.5. CONTEO CELULAR CON HEMATOCITÓMETRO.

El hematocitómetro es una gruesa placa de cristal con forma de portaobjetos, de unos 30 x 70 mm y unos 4 mm de grosor. En este caso la cámara es doble, son las más comunes, y en ella existen 2 zonas de conteo, una superior y otra inferior al eje longitudinal de la cámara. La reticula completa mide 3 mm x 3 mm de lado. Subdividida a su vez en 9 cuadrados de 1mm de lado cada uno. Figura. 3.

El cuadrado central se divide en 25 cuadrados medianos de 0,2 mm de lado y cada uno de estos cuadros se subdivide a su vez en 16 cuadrados pequeños. El cuadrado central está por tanto formado por 400 cuadrados pequeños.

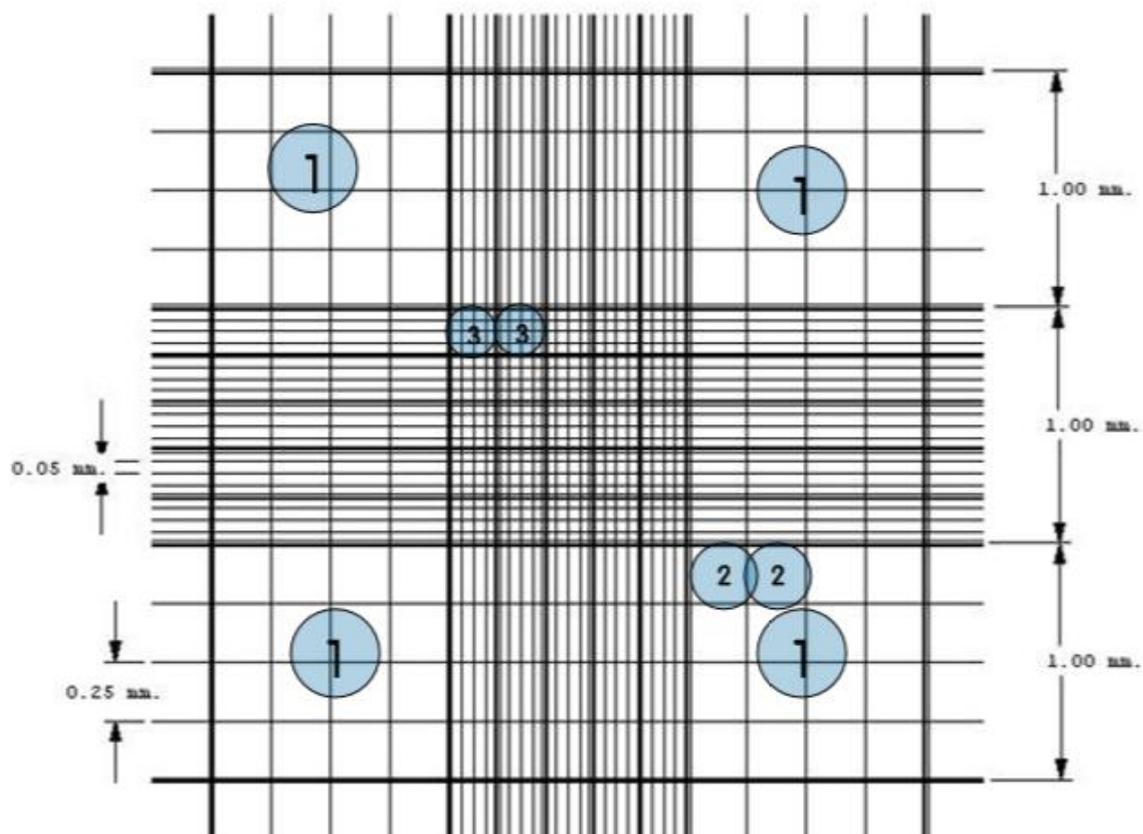


Figura 3. Detalle de la rejilla de la cámara de Neubauer Improved.

La técnica llevada a cabo fue la siguiente:

PASO 1. Se introduce la muestra en la cámara de Neubauer, para ello utilizamos una pipeta Pasteur, a la que previamente hemos cortado una parte de su punta e introducimos una gota en la cámara. Por último colocamos el cubreobjetos.

PASO 2. Se coloca la cámara de Neubauer en la bandeja del microscopio, se enciende el microscopio y se enfoca hasta que se vean las células nítidas.

PASO 3. Realizamos el recuento de células. Hay que tener en cuenta, que aquellas células que se encuentren tocando el límite superior e izquierdo no se contabilizan.

PASO 4. Cálculo de la concentración aplicando la fórmula del cálculo de concentración celular:

$$\text{Concentración celular (cel / ml)} = \text{número de células} / \text{volumen (en ml)}.$$

- El número de células es la suma de todas las células contadas en todos los cuadros.
- El volumen es el volumen total de todos los cuadros donde hemos hecho el recuento.
- El volumen de 1 cuadro grande es:

$$0,1 \text{ cm} \times 0,1 \text{ cm} = 0,01 \text{ cm}^2 \text{ de superficie.}$$

$$0,01 \text{ cm}^2 \times 0,1 \text{ mm (profundidad)} = 0,01 \text{ cm}^2 \times 0,01 \text{ cm} = 0,0001 \text{ cm}^3 = 0,0001 \text{ ml.}$$

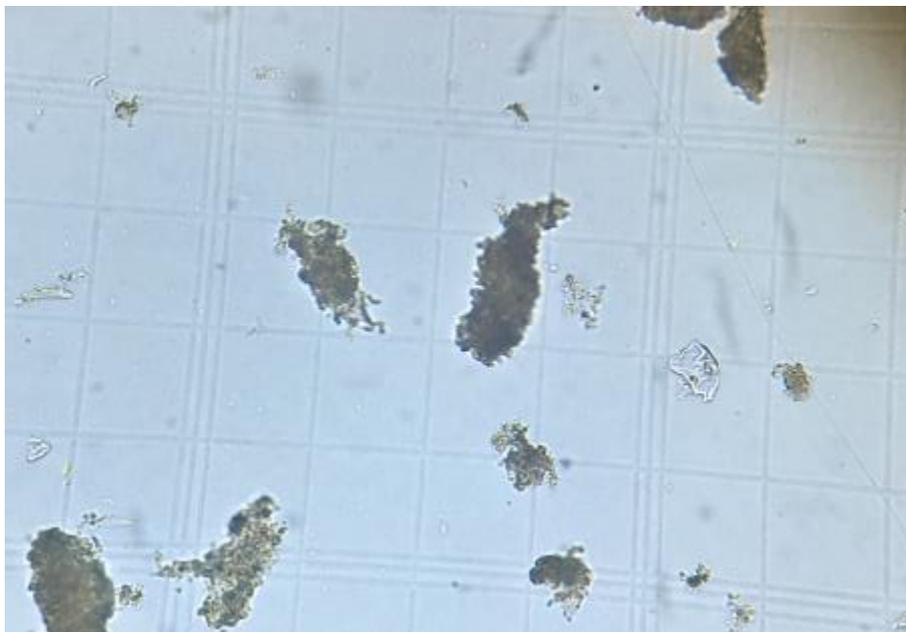


Figura 4. Observación y conteo de células en la Cámara de Neubauer, podemos ver los distintos aglomerados así como la división de dicha cámara.

3.6. TINCIÓN CON AZUL DE METILENO.

La elaboración de tintes es una de las actividades más antiguas del ser humano. Hasta mediados del siglo XIX, los ingredientes básicos de los tintes procedían de las plantas, ya con la llegada de la revolución industrial el químico alemán Heinrich Caro consiguió sintetizar por primera vez el azul de metileno en 1876.

Con el objetivo de visualizar células se llevó a cabo la técnica de tinción con el azul de metileno. Para ello se prosiguió de la siguiente manera:

En primer lugar, se elaboró el colorante, para ello pesamos 3 gramos del colorante azul de metileno, lo añadimos a un vaso de precipitado e introducimos 20 ml de etanol al 95%. Disolvemos el colorante en el alcohol y le añadimos 100 ml de agua destilada. Finalmente, con la ayuda de un embudo, introducimos la disolución en una botella ámbar para su posterior uso.

En segundo lugar, se realizó un frotis de la muestra a observar, añadiendo con la ayuda de una pipeta Pasteur con su punta cortada una gota sobre un portaobjetos. Seguidamente, con la ayuda de unas pinzas de madera se pasó el portaobjetos por la llama del mechero con el fin de fijar las células con el calor.

Una vez que hacemos esto, añadimos unas 2 gotas del colorante azul de metileno y lo dejamos actuar unos 2-3 minutos. Lavamos el exceso de colorante con agua destilada, dejamos secar la muestra al aire y por último, colocamos un cubreobjetos sobre la muestra para su observación al microscopio.

3.7. ESTUDIO ESTADÍSTICO.

Para la realización de las gráficas de seguimiento, se utilizó el programa informático Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 10.0 (spss Inc, 1999), además del programa Excel 2013.

Para el análisis de los resultados se realizó diagramas de cajas, utilizando los valores promedios observados durante 21 días, además de gráficas lineales comparando los dos medios anteriormente descritos, realizando 6 conteos al día, dividido en dos conteos en tres Erlenmeyers distintos y para cada medio.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. CONTEO CÉLULAR.

Los recuentos se hicieron de forma periódica contabilizándose en el momento del subcultivo (Día 1), después de 3 días, a los 7 días, a los 10 días, a los 14 días, a los 17 días y por último a los 21 días.

La manera en que se realizó dicho conteo fue de la siguiente forma: cada día previsto para llevar a cabo el conteo, se utilizaban tres Erlenmeyers distintos que contienen el Medio 1 y otros tres Erlenmeyers con el Medio 2. En las siguientes tablas se muestran los resultados obtenidos cada día.

DÍA 1	MUESTRA	Nº DE CÉLULAS	AGREGADOS DE MÁS DE 15 CÉLULAS
	1	1474000	12
	1.1	1646000	11
	2	1574000	9
	2.1	1518000	16
	3	1748000	17
	3.1	1738000	12

DÍA 3	MUESTRA	Nº DE CÉLULAS	AGREGADOS DE MÁS DE 15 CÉLULAS
	1	1608000	15
	1.1	1820000	13
	2	1868000	12
	2.1	1970000	17
	3	1816000	11
	3.1	2002000	21

DÍA 7	MUESTRA	Nº DE CÉLULAS	AGREGADOS DE MÁS DE 15 CÉLULAS
	1	2112500	15
	1.1	2217500	16
	2	2222500	19
	2.1	2252500	13
	3	1912500	23
	3.1	2192500	11

DÍA 10	MUESTRA	Nº DE CÉLULAS	AGREGADOS DE MÁS DE 15 CÉLULAS
	1	2374000	15
	1.1	2284000	23
	2	2486000	24
	2.1	2454000	22
	3	2468000	21
	3.1	2498000	13

DÍA 14	MUESTRA	Nº DE CÉLULAS	AGREGADOS DE MÁS DE 15 CÉLULAS
	1	2714000	32
	1.1	2812000	23
	2	2810000	28
	2.1	2896000	27
	3	3100000	33
	3.1	2826000	7

DÍA 17	MUESTRA	Nº DE CÉLULAS	AGREGADOS DE MÁS DE 15 CÉLULAS
	1	2906000	23
	1.1	2840000	31
	2	2888000	32
	2.1	2816000	23
	3	3206000	27
	3.1	2754000	26

DÍA 21	MUESTRA	Nº DE CÉLULAS	AGREGADOS DE MÁS DE 15 CÉLULAS
	1	2930000	31
	1.1	2850000	31
	2	2902000	27
	2.1	2842000	22
	3	2912000	21
	3.1	2902000	22

Tabla 3. Tabla en la que se muestra el número de células y agregados de más de 15 células contabilizados el mismo día, en seis repeticiones, es decir, dos repeticiones por Erlenmeyer estudiado, para aquellos con el Medio 1.

DÍA 1	MUESTRA	Nº DE CÉLULAS	AGREGADOS DE MÁS DE 15 CÉLULAS
	1	1474000	12
	1.1	1646000	13
	2	1526000	12
	2.1	1518000	14
	3	1746000	9
	3.1	1662000	13

DÍA 3	MUESTRA	Nº DE CÉLULAS	AGREGADOS DE MÁS DE 15 CÉLULAS
	1	1608000	15
	1.1	1934000	14
	2	1868000	15
	2.1	1906000	10
	3	1816000	15
	3.1	1958000	12

DÍA 7	MUESTRA	Nº DE CÉLULAS	AGREGADOS DE MÁS DE 15 CÉLULAS
	1	2086000	15
	1.1	2152000	16
	2	2246000	17
	2.1	2200000	12
	3	1952000	9
	3.1	2152000	7

DÍA 10	MUESTRA	Nº DE CÉLULAS	AGREGADOS DE MÁS DE 15 CÉLULAS
	1	2374000	15
	1.1	2284000	19
	2	2486000	18
	2.1	2454000	19
	3	2468000	17
	3.1	2498000	18

DÍA 14	MUESTRA	Nº DE CÉLULAS	AGREGADOS DE MÁS DE 15 CÉLULAS
	1	2466000	16
	1.1	2540000	17
	2	2546000	19
	2.1	2546000	19
	3	2644000	17
	3.1	2624000	21

DÍA 17	MUESTRA	Nº DE CÉLULAS	AGREGADOS DE MÁS DE 15 CÉLULAS
	1	2572000	17
	1.1	2628000	19
	2	2694000	21
	2.1	2404000	19
	3	2592000	15
	3.1	2754000	19

DÍA 21	MUESTRA	Nº DE CÉLULAS	AGREGADOS DE MÁS DE 15 CÉLULAS
	1	2724000	15
	1.1	2374000	16
	2	2444000	17
	2.1	2592000	17
	3	278000	18
	3.1	2784000	23

Tabla 4. Tabla en la que se muestra el número de células y agregados de más de 15 células contabilizados el mismo día, en seis repeticiones, es decir, dos repeticiones por Erlenmeyer estudiado, para aquellos con el Medio 1.

4.2. ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DE CÉLULAS.

Tras el conteo anterior, se realizó un gráfico lineal para evaluar la evolución del contenido de células en los distintos medios. Para ello, se evaluaron los valores medios de cada día y representaron en la Figura 5.

Según los protocolos usados, se observó que aquellos Erlenmeyers que contenían el Medio 1 presentaban mayor crecimiento de células que aquellos con el Medio 2. En un principio, a pesar de presentar una concentración aproximadamente igual en el momento del subcultivo, al cabo

de tres días se observa que los cultivos creciendo en el Medio 1 presenta un crecimiento más pronunciado que aquellos con el Medio 2. Transcurrida una semana, las concentraciones se hacen casi iguales, pero a partir de los 10 días se observa un cambio significativo en las concentraciones, ya que los Erlenmeyers con el Medio 1 siguen creciendo de forma exponencial hasta el día 14, formándose posteriormente una fase estacionaria, que hace que transcurridos 21 días, la concentración celular vaya disminuyendo. Por su parte, aquellos Erlenmeyers con el medio 1, después de los 10 días siguen aumentando su concentración celular, pero con una diferencia significativa con respecto al Medio 1.

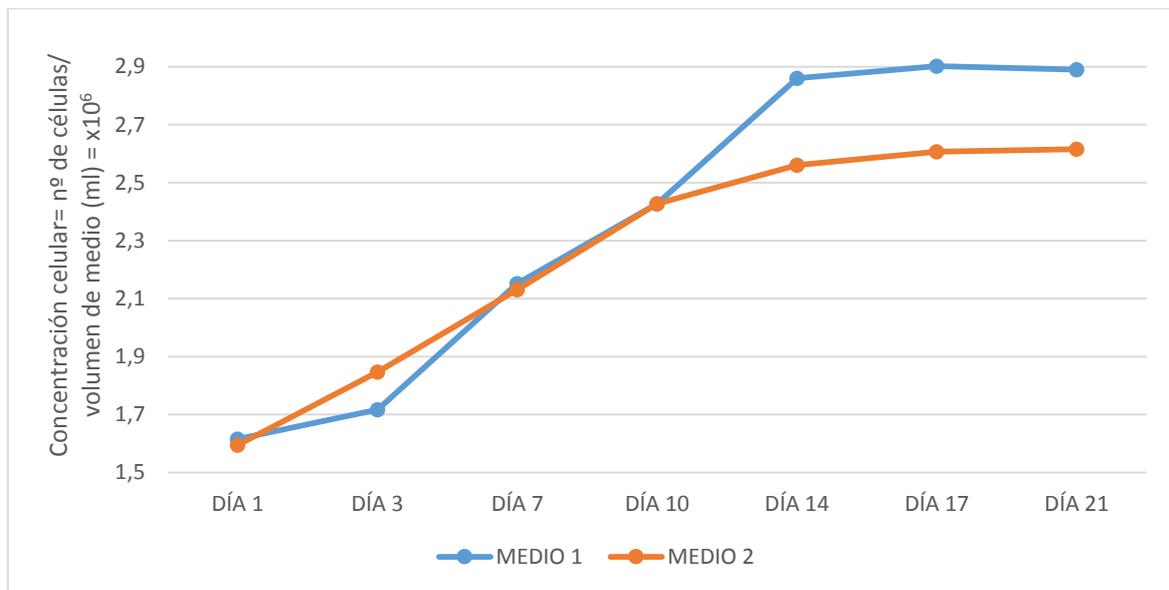


Figura 5. Evaluación de la concentración de células en los distintos medios por días.

Por otro lado, se observaron aglomerados de más de 15 células, que presentaban un patrón de crecimiento como el que se observa en la Figura 6. Como podemos observar en dicha gráfica, vemos que con el paso de los días el Medio 1 presenta un aumento de los aglomerados, es decir, se produce un aumento de la concentración de células. En cambio, los Erlenmeyers con el medio 2, presentan una disminución significativa a los 7 días, para nuevamente aumentar y mantenerse de forma exponencial desde el día 10 al 21.

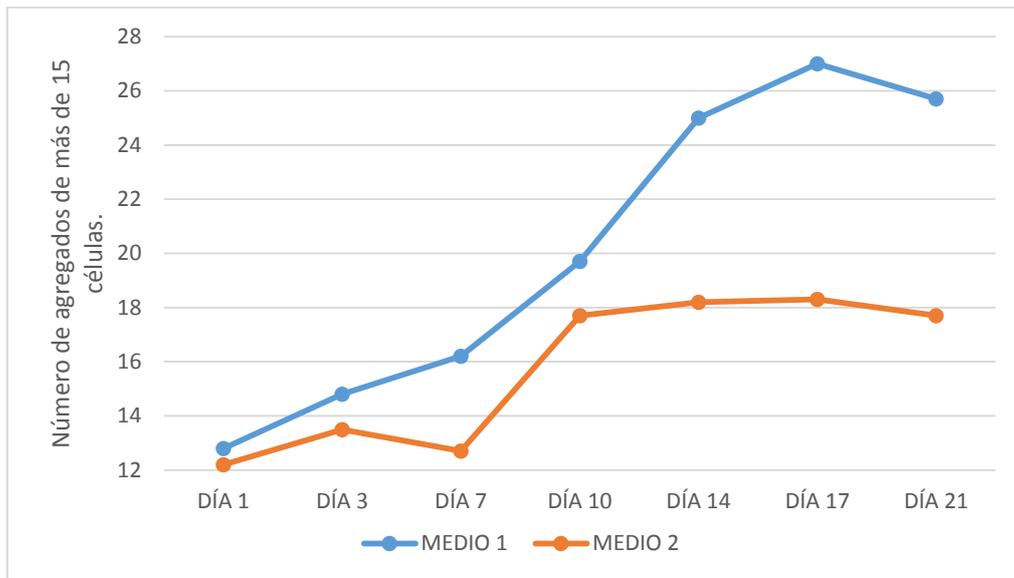


Figura 6. Evaluación del número de aglomerados de más de 15 células en los distintos medios por días.

Los diagramas de Caja-Bigotes (boxplots o box and whiskers) son una presentación visual que describe varias características importantes, al mismo tiempo, tales como la dispersión y simetría.

Para su realización, se representan los tres cuartiles y los valores mínimo y máximo de los datos, sobre un rectángulo, alineado horizontal o verticalmente. Una gráfica de este tipo consiste en una caja rectangular, donde los lados más largos muestran el recorrido intercuartílico. Este rectángulo está dividido por un segmento vertical que indica donde se posiciona la mediana y por lo tanto su relación con los cuartiles primero y tercero (recordemos que el segundo cuartil coincide con la mediana). Esta caja se ubica a escala sobre un segmento que tiene como extremos los valores mínimo y máximo de la variable.

Las líneas que sobresalen de la caja se llaman bigotes. Estos bigotes tienen un límite de prolongación, de modo que cualquier dato o caso que no se encuentre dentro de este rango es marcado e identificado individualmente.

En las siguientes gráficas se muestran los diagramas de caja y bigotes tanto para el crecimiento celular en el Medio 1, como para el Medio 2.

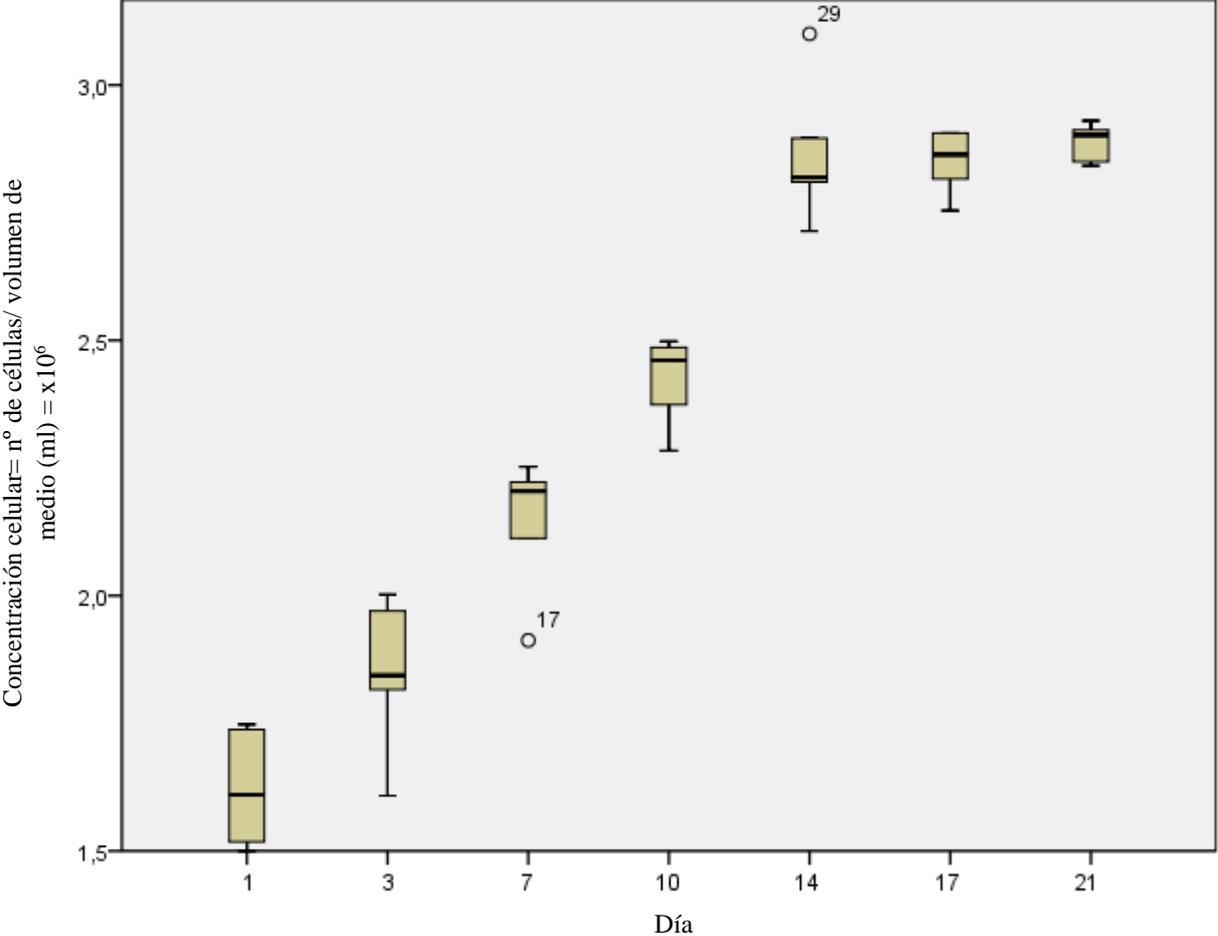


Figura 7. Diagrama de Cajas y Bigotes para el Medio 1.

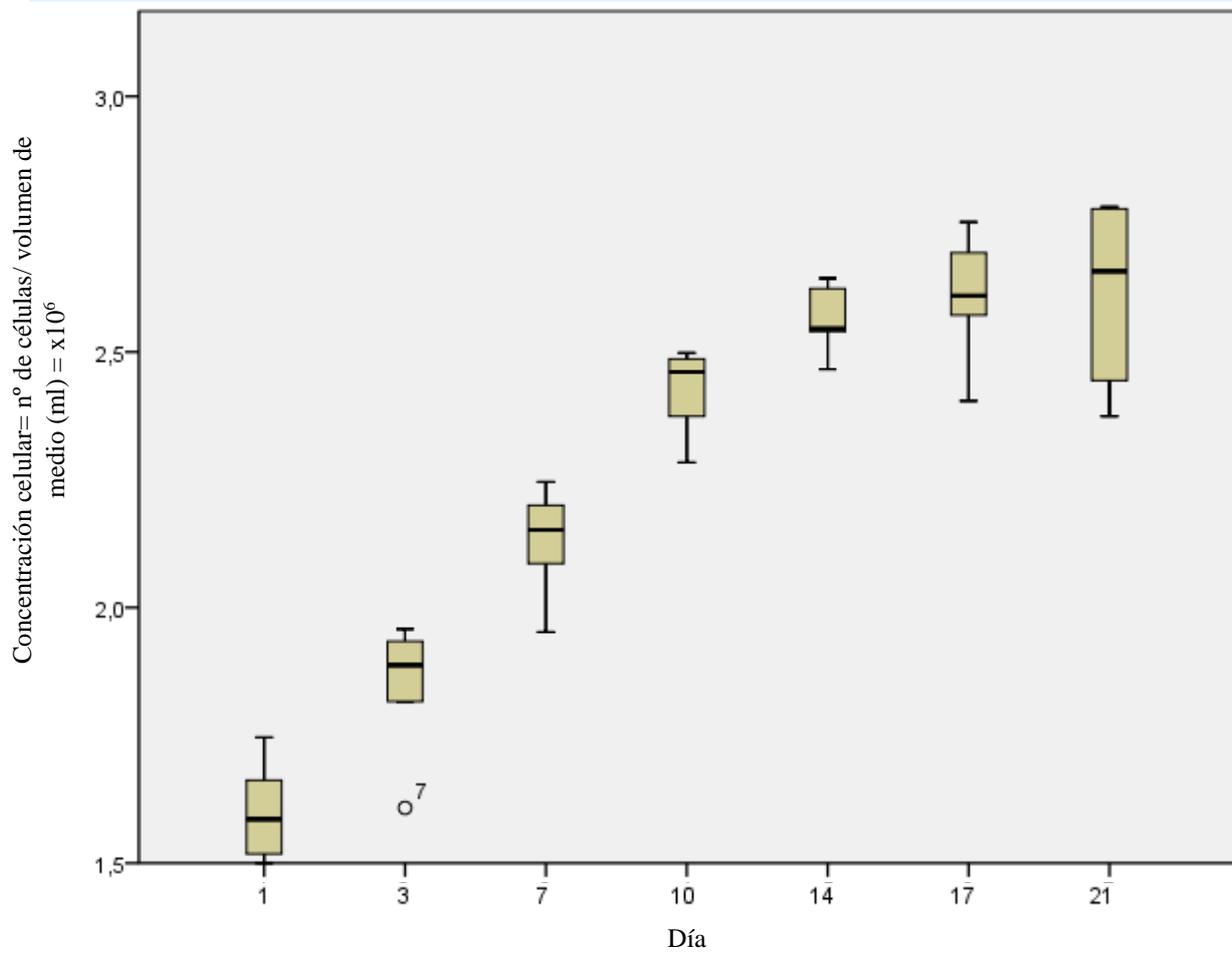


Figura 8. Diagrama de Cajas y Bigotes para el Medio 2.

4.4 OBSERVACIONES EN MICROSCOPIO DE CÉLULAS Y AGREGADOS.



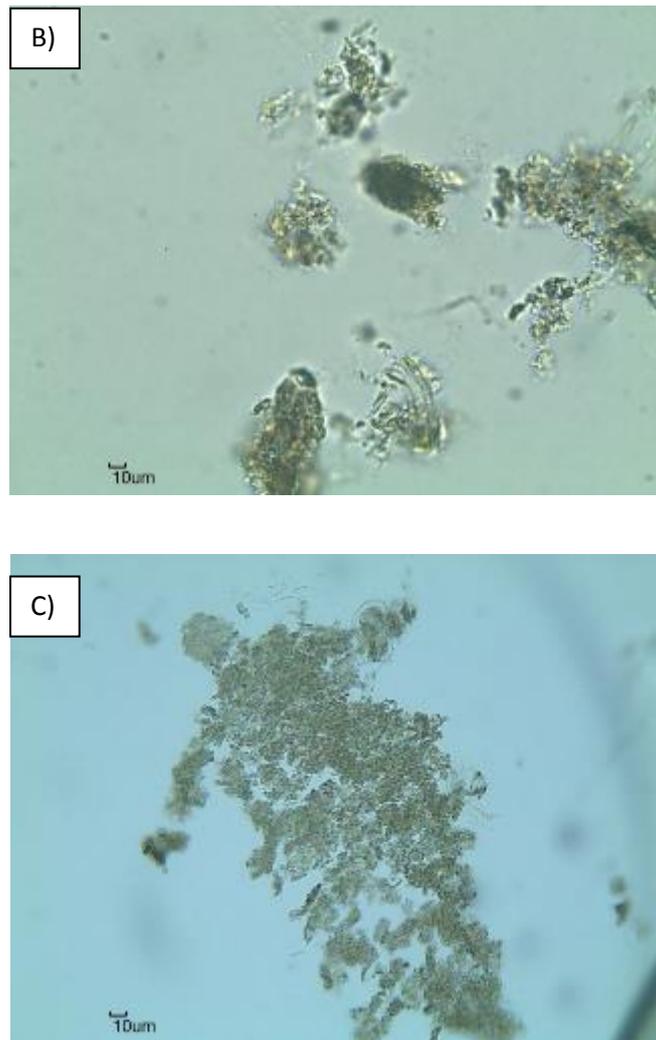
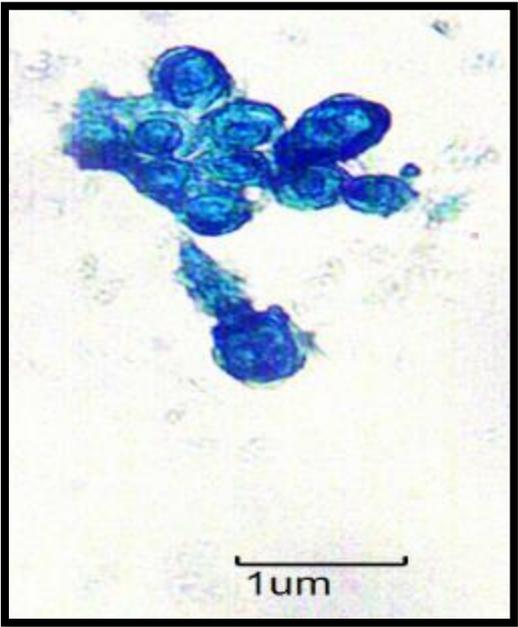


Figura 9. Observación de aglomerados en fresco tras 7 días de cultivo. A) Aglomerados celulares vistos con el objetivo 4x. B) Aglomerados celulares observados con el objetivo 10x. C) Aglomerado celular visto con el objetivo 40x.

Las células vegetales en suspensión tienden a formar agregados de manera natural ya que al dividirse no se separan adecuadamente, lo cual puede afectar a la producción de metabolitos secundarios. Probablemente por el estrés nutricional, especialmente de oxígeno, que es causado por la limitación a la transferencia de masa en los agregados y por la diferenciación celular dentro de los mismos.

A)



B)

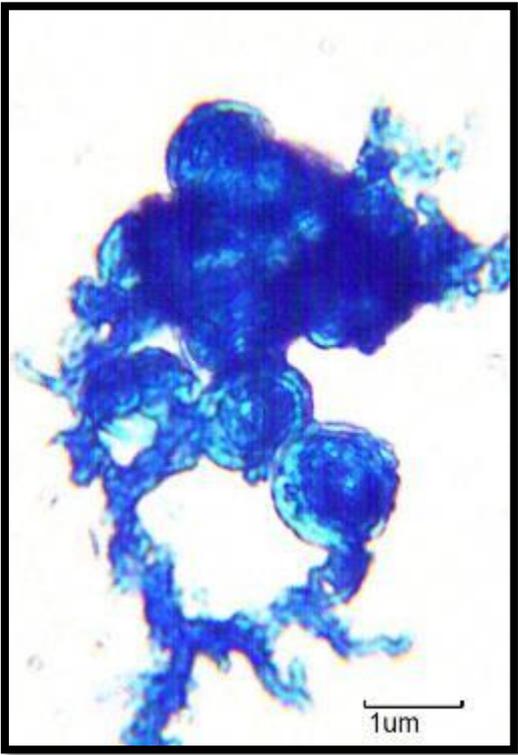
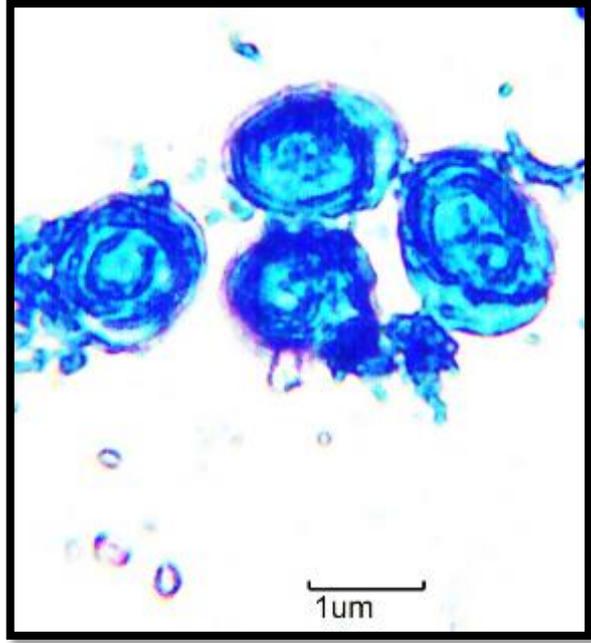


Figura 10. Observación de células con la tinción azul de metileno. A) Se observa un aglomerado formado por 9 células más una que se ha separado de este, observado en el microscopio en un aumento de 40x. B) Aglomerado celular en el que se observa dos células, visto con el objetivo 100x.

C)



D)

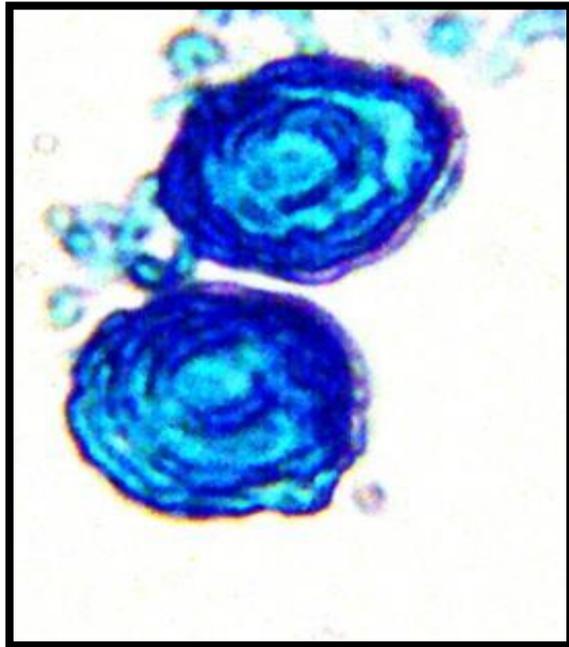


Figura 11. Observación de células con la tinción azul de metileno.. C) Vista de 4 células individuales con el objetivo 100x. D) Observación de dos células individuales con el objetivo 100x.

5. CONCLUSIONES.

- The response of the two cell culture assays used was different. Medium 1 being the most appropriate to promote the growth of plant cells in suspension.
- Both media form cell aggregates, this being a typical feature of plant cell cultures in suspension.
- It is recommended to use some method to disaggregate the cell groups in individual cells or aggregates of no more than 10 cells.
- From the third day of culture, was observed an exponential growth that continues until day 14.
- While from day 14, the cells enter a stationary phase because in all likelihood the depletion of nutrients in the culture medium.

6. BIBLIOGRAFÍA.

- G. Calva, J. Pérez 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria* Vol.6 No 11, 1067-6079.
<http://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/art104a.htm>
- Arias, M., Aguirre, A., Angarita, M., Montoya, C., Restrepo, J. 2009. Aspectos Ingenieriles del Cultivo In Vitro de Células Vegetales para la Producción de Metabolitos Secundarios. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal* Vol. 76, No. 157, 109-121.
https://www.researchgate.net/profile/Juan_Manuel_Restrepo-Florez/publication/44130944_ASPECTOS_INGENIERILES_DEL_CULTIVO_IN_VITRO_DE_CELULAS_VEGETALES_PARA_LA_PRODUCCION_DE_METABOLITOS_SECUNDARIOS/links/5400b36c0cf2bba34c1a5a71.pdf
- B. Pant, S. Manandhar 2007. *In Vitro* propagation of carrot (*Daucus carota*) L. *Scientific World*, Vol. 5, No. 5.
- D. Punchooa, R. Ramburn 2004. A Study on the use of carrot juice in the tissue cultura of *Daucus carota*. *African Journal of Biotechnology* Vol. 3 (4), 248-252.
- Megías M, Molist P, Pombal M 2016. ATLAS de HISTOLOGÍA VEGETAL y ANIMAL. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología. Universidad de Vigo. <http://mmegias.webs2.uvigo.es/mmegias/inicio.html>

- Dodds J, Roberts L. 1985. Cell suspensión cultures, Experiments in Plant Tissue Culture. 232 páginas. Cambridge University Press.
- Montuenga L, Esteban F, Calvo A. 2009. Técnicas en Histología y Biología Celular. 392 páginas. Barcelona, España.
- Toledo J, Espinoza N, Golmirzaie A. 1998. Cultivo de Tejidos: Manejo de Plántulas *In Vitro* en la Producción de Semilla de Papa. Centro Internacional de la Papa (CIP). Manual de Capacitación. 46 páginas. Lima, Perú.
- <http://www.infoagro.com/hortalizas/zanahoria.htm> (21/06/2016)
- <file:///C:/Users/Abraham/Downloads/CULTIVO%20DE%20C%3%89LULAS%20Y%20EJIDOS.CalvayP%3%A9rez.pdf> (21/06/2016)
- <file:///C:/Users/Abraham/Downloads/Historia%20cultivo%20de%20tejidos%20vegetales.pdf> (21/06/2016)
- <https://docs.google.com/viewer?a=v&pid=sites&srcid=ZmNhLmVkdS5jb3xqYW5lci1wb2xvfGd4OjcxNDI0NGQwZWUyNWFhMDM> (21/06/2016)
- <http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neubauer.pdf> (18/07/2016)
- <http://www.ciens.ucv.ve:8080/generador/sites/andrea.menendez/archivos/Guia%20Cultivo%20de%20Tej%20Veg%20II%202012.pdf> (18/07/2016)
- http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_agronomicas/fernadezg01/apendice2.html (18/07/2016)