



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

Determinación del efecto inhibitorio en la embriogénesis somática de *Daucus carota* por compuestos encontrados en el medio condicionado de *Coffea arabica*

Tesis que presenta

Yuri Jazmín Solís Espinosa

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2012

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO



Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado “Determinación del efecto inhibitorio en la embriogénesis somática de *Daucus carota* por compuestos encontrados en el medio condicionado de *Coffea arabica*” fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,



Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela

Director Académico

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Mérida, Yucatán, México a 26 de enero de 2012.



Yuri Jazmín Solís Espinosa

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado "Estudio de la función de las auxinas en la inducción de la embriogénesis somática en *Coffea* spp (Conacyt No. 157014)", bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecer es una palabra que me ha acompañado a lo largo tesis, por lo tanto, mi lista sería interminable; sin embargo, tratare de hacerlo lo más breve posible.

En primera instancia me gustaría agradecer a mi asesor el Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas, por aceptarme para trabajar en su equipo de laboratorio y enseñarme que el camino de un futuro investigador no solo de basa en trabajar en laboratorio, sino que un verdadero investigador debe tener una cultura general muy amplia, porque solo así uno puede formularse preguntas para tratar de entender lo que sucede en la naturaleza y de este modo poder tratar de copiarlo a nivel laboratorio. Muchas gracias doctor.

A mi comité evaluador Dra. Nancy Santaana Buzzy, Dra. Ileana Echevarría Machado, Dr. Manuel Martínez Estévez, Dr. Víctor Suárez, por su ayuda para la realización de esta tesis.

A los técnicos, Felipe Alonso Barredo y Rosa María Galaz Ávalos, por ayudarme con su gran experiencia en numerosas técnicas de laboratorio y por su amistad que me brindaron a lo largo de estos años.

A todos mis amigos, que han formado indirectamente parte para la realización de esta tesis, debido a que por su amistad han hecho que los momentos arduos de trabajo pasen desapercibidos, ya que las risas fueron más que el cansancio. A mis amiguis: Mariana, Heidy, Cristy que me brindaron consejos para hacer lo mejor posible esta tesis y me apoyaron cuando más lo necesite. A la comunidad jarocho y asociados que sin ellos la vida sería menos divertida.

A mi leal y por siempre amigo Jose Hoil, porque a pesar de la distancia nuestra amistad no ha menguado y siempre ha estado disponible para mí cuando lo he necesitado y sobre todo por compartir conmigo todo mí embarazo.

A mis compañeros del laboratorio: Laura, Fátima, Celia, Sara, Tere, Bianca, Geovanny, Benjamín, Miguel, Filiberto, Javier, Randy, Jacobo, Jorge, por su compañía en el laboratorio y los momentos divertidos que pasamos en este transcurso de mi vida, siempre los tendré en mis recuerdos.

DEDICATORIAS

Esta tesis se la dedico a mi familia quienes me han apoyado en los momentos más difíciles de mi vida y me dieron el amor y consejos necesarios para no dejarme vencer y poder concluir esta tesis.

A mi madre Olga Espinosa Canche, que me dio los ánimos para seguir estudiando y compartió la dicha que sentí cuando me aceptaron en el posgrado. También, por todo el apoyo y cuidados que me brindo durante todo mi embarazo y que aunque fue cansado, mi madre siempre estuvo presente.

A mis hermanos: Yassir e Irving, por darme ánimos para no dejarme vencer por los obstáculos que se me prestaron durante la realización de esta tesis y sobre todo a mi hermana y segunda madre Brenda, porque ella ha sido un apoyo muy especial en poder lograr esta tesis, ya que sin su ayuda con el cuidado de Paloma esta tesis no habría sido posible finalizarla. Gracias por todo el amor que me das y le das a Paloma.

Y por último, quiero dedicar esta tesis a Perfecto Santiago Sotelo quien se presentó en el momento y lugar adecuado en mi vida. Porque fuiste la persona quien me hizo recordar el motivo de porque comencé a estudiar un posgrado y quien me impulso a seguir adelante, pero sobre todo, porque con amor y paciencia estuvo junto a mí en los momentos más duros de la tesis (sobre todo las malas noches). Te amo.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES	3
1. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	3
2. FACTORES INVOLUCRADOS EN LA ES	4
OBJETIVO GENERAL	5
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
JUSTIFICACIÓN.....	6
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	7
BIBLIOGRAFÍA	7
CAPÍTULO II	11
ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DE LA ES EN <i>D. CAROTA</i> POR COMPUESTOS FENÓLICOS	11
2.1. INTRODUCCIÓN.....	11
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
2.2.1. GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS	11
2.2.2. GENERACIÓN DE CALLO DEL TUBÉRCULO	12
2.2.3. INDUCCIÓN DE SUSPENSIONES CELULARES	12
2.2.3.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS SUSPENSIONES CELULARES	13
2.2.3.1.1. VOLUMEN FINAL DEL MEDIO DE CULTIVO.....	13
2.2.3.1.2. PH.....	14

2.2.3.1.3. CONDUCTIVIDAD.....	14
2.2.3.1.4. PESO FRESCO.....	14
2.2.3.1.5. PESO SECO.....	14
2.2.3.1.6. VOLUMEN DE PAQUETE CELULAR.....	14
2.2.3.1.7. NÚMERO DE CÉLULAS.....	14
2.2.4. INDUCCIÓN DE ES A PARTIR DE SUSPENSIONES CELULARES.....	15
2.2.5. EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO MEDIANTE UN ESTUDIO DOSIS-RESPUESTA.....	15
2.3. RESULTADOS.....	15
2.3.1. GERMINACIÓN DE SEMILLAS.....	15
2.3.2. GENERACIÓN DE CALLOS DEL TUBÉRCULO.....	16
2.3.3. INDUCCIÓN DE LAS SUSPENSIONES CELULARES.....	18
2.3.3.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS SUSPENSIONES CELULARES.....	20
2.3.3.1.1. PH DEL MEDIO DE CULTIVO.....	20
2.3.3.1.2. CONDUCTIVIDAD.....	22
2.3.3.1.3. PESOS FRESCO Y SECO.....	22
2.3.3.1.4. VOLUMEN DE PAQUETE CELULAR.....	24
2.2.3.1.5. NÚMERO DE CÉLULAS.....	25
2.3.4. INDUCCIÓN DE LA ES.....	25
2.3.5. EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO MEDIANTE DOSIS-RESPUESTA.....	27
2.4. DISCUSIÓN.....	34
3. BIBLIOGRAFÍA.....	36

CAPÍTULO III	41
ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DE LA ES EN D. CAROTA POR COMPUESTOS FENÓLICOS	41
3. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	41
3.1. CONCLUSIONES.	41
3.2. PERSPECTIVAS.....	41

LISTADO DE FIGURAS

- Figura 2.1. Desinfestación y siembra de semillas de *D. carota*. a) Lavado de semillas con detergente 40 min. b) Lavados con etanol al 70% e hipoclorito de sodio al 1%. c) Siembra de 7 semillas por caja magenta. d) Visualización de la semilla a través del estereoscopio. 16
- Figura 2.2. Obtención de plantas de *D. carota*. a) Cero días, b) Plántula de 7 días. c) Plántulas de 14 días. d) Plántulas de 21 días de edad..... 16
- Figura 2.3. Asepsia de tubérculos de zanahoria. a) Eliminación de impurezas de la zanahoria. b) Lavados con hipoclorito de sodio al 1%. C) Cortes transversales que contienen cambium vascular. d) Obtención de los explantes. 17
- Figura 2.4. Obtención de callos de *D. carota* después de tres semanas de inducción en el medio B₅ basal suplementado con 3% de sacarosa y 4.5 μ M de 2-4 D. Los números representan días. 17
- Figura 2.5. Línea de callos proveniente del tubérculo de zanahoria. a) Vista de los callos a través del estereoscopio. b) Vista superior de los callos obtenidos después de 140 días posterior a la inducción. c) Mantenimiento de la línea de callos del tubérculo de zanahoria en medio líquido B₅ basal suplementado con 3% de sacarosa y 4.5 μ M de 2-4 D. 18
- Figura 2.6. Inducción de suspensiones celulares de *D. carota* provenientes de tubérculos de zanahoria desde el día 0 hasta los 42 días después de su inducción. El medio de cultivo se renovaba cada 14 días. 19
- Figura 2.7. Obtención de una línea celular compuesta por células finas y con una rápida división celular. a) En el panel a se puede observar el aumento de densidad con el paso de los días de cultivo y en el panel b) se realizó un acercamiento y se observa que del día 14 al 28 la línea celular decae. 20
- Figura 2.8. Comportamiento del pH del medio de las suspensiones celulares de *D. carota* durante el ciclo de cultivo de 24 días. 21
-

Figura 2.9. Crecimiento de las suspensiones celulares de <i>D. carota</i> estimando el peso fresco (cuadros azules) y la conductividad del medio de cultivo (cuadros rojos) durante el ciclo de cultivo de 24 días.	22
Figura 2.10. Crecimiento de las suspensiones celulares de <i>D. carota</i> estimando el peso fresco (cuadros verdes), peso seco (cuadros rojos) y la conductividad del medio de cultivo (cuadros verdes) durante el ciclo de cultivo de 24 días.	23
Figura 2.11. Crecimiento de las suspensiones celulares de <i>D. carota</i> estimando el peso fresco (cuadros rojos, panel izquierdo), peso seco (cuadros rojos, panel derecho) y el volumen del paquete celular (cuadros azules, ambos paneles) durante el ciclo de cultivo de 24 días.	24
Figura 2.12. Crecimiento de las suspensiones celulares de <i>D. carota</i> estimando el número de células durante el ciclo de cultivo de 24 días.	25
Figura 2.13. Obtención de la ES en <i>D. carota</i> con suspensiones celulares de 21 días con diferentes tipos de malla de nylon y diferentes densidades celulares	26
Figura 2.14. Obtención de embriones somáticos a los 14 días usando diferentes días de inducción en suspensiones celulares de <i>D. carota</i>	27
Figura 2.15. Determinación del efecto inhibitorio de la ES de <i>D. carota</i> con 1 μ M de ácido cinámico (AC), ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico (pH) y cafeína (CF) a diferentes días de inducción 5, 7 y 9 días.	28
Figura 2.16. Determinación del efecto inhibitorio de la ES de <i>D. carota</i> con 10 μ M de ácido cinámico (AC), ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico (pH) y cafeína (CF) a diferentes días de inducción 5, 7 y 9 días.	29
Figura 2.17. Determinación del efecto inhibitorio de la ES de <i>D. carota</i> con 100 μ M de ácido cinámico (AC), ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico (pH) y cafeína (CF) a diferentes días de inducción 5, 7 y 9 días.	30
Figura 2.18. Determinación del efecto inhibitorio de la ES de <i>D. carota</i> con 1,000 μ M de	

ácido cinámico (AC), ácido *p*-hidroxibenzoico (pH) y cafeína (CF) a diferentes días de inducción, 5, 7 y 9 días. 31

Figura 2.19. Efecto de la inhibición de la ES producido por ácido cinámico (Ac), ácido *p*-hidroxibenzoico (pH) y cafeína (Cf). Las barras representan el error estándar (n=3). 32

Figura 2.20. Efecto de la inhibición de la ES producido por ácido cinámico (Ac), ácido *p*-hidroxibenzoico (pH) y cafeína (Cf). Las barras representan el error estándar (n=3). 33

Figura 2.21. Efecto de la inhibición de la ES producido por ácido cinámico (Ac), ácido *p*-hidroxibenzoico (pH) y cafeína (Cf). Las barras representan el error estándar (n=3). 34

ABREVIATURAS

Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	2-4 D
Embriogénesis somática	ES
Embriogénesis somática indirecta	ESI
High Performance Liquid Chromatography	HPLC
Medio Murashige y Skoog	MS
Revoluciones por minuto	rpm

RESUMEN

La embriogénesis somática es una poderosa herramienta biotecnológica, que acoplada a programas de mejoramiento genético, proporciona resultados satisfactorios relacionados con la obtención de nuevas variedades vegetales, así como, en la propagación masiva de cultivares de importancia comercial. Sin embargo, en ciertas ocasiones, la embriogénesis somática es recalcitrante en algunas especies vegetales. Por lo tanto, es de suma importancia descubrir las condiciones óptimas y requerimientos necesarios para la inducción, así como los fenómenos inhibitorios de cada variedad vegetal.

Por lo tanto en este proyecto de investigación se caracterizaron tres compuestos que fueron descubiertos en el medio condicionado de *Coffea Arabica*, capaces de inhibir el proceso embriogénico, tanto en *C. arabica*, como en *C. canephora*. Estos compuestos son el ácido cinámico, el *p*-hidroxibenzoico y la cafeína. Se llevó a cabo un análisis de curso temporal durante los primeros tres días de post-inducción de la embriogénesis somática en *Daucus carota* (suspensiones celulares). En este estudio, se utilizaron las concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 mM. Se observó una inhibición muy marcada de la embriogénesis somática en zanahoria al utilizar las concentraciones mayores de cada compuesto.

ABSTRACT

Somatic embryogenesis is a powerful biotechnological tool that when used coupled with breeding programs, usually produce very encouraging results related to the development of new plant varieties, or the mass propagation of elite cultivars. However, this process is sometimes not very easy; sometimes plant species tend not to respond.

In this research project we used three inhibitors discovered in the conditioned medium of *Coffea arabica*, these compounds are able to inhibit the somatic embryogenic process, both in *C. arabica* and *C. canephora*. The compounds are cinnamic and p-hydroxybenzoic acids and caffeine. In this research, these compounds were tested at concentrations of 1, 10, 100 and 1000 μM) for three different days after initiation of induction of somatic embryogenesis in *Daucus carota*. All three compounds inhibited carrot somatic embryogenesis, particularly at the highest concentration.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad se han obtenido grandes avances en la genética y biotecnología de plantas gracias el uso del cultivo *in vitro*. Entre los diferentes sistemas *in vitro* aplicados se encuentra la embriogénesis somática (ES). La ES tiene como base la totipotencialidad celular (única en las células vegetales). La ES una herramienta útil en la investigación básica sobre la totipotencia y sobre los procesos fundamentales de la morfogénesis de la planta (Gaj, 2004; Quiroz-Figueroa et al., 2006; Zimmerman, 1993).

La ES consiste en la formación, diferenciación y desarrollo de embriones, a partir de células que no son el producto de una fusión gamética (Tisserat, 1985). Este fenómeno fue descubierto en dos Umbelliferae, zanahoria (*Daucus carota*) (Reinert, 1959; Steward et al., 1958) y *Oenanthe aquatica* (Krikorian y Simola, 1999) en la década de los 50 y desde entonces, éste ha sido el modelo más empleado para estudiar la ES. Entre las ventajas que presenta la ES se encuentra la gran cantidad de plantas regeneradas en menos tiempo, la baja frecuencia en las quimeras obtenidas y la limitada variación somaclonal, si la comparamos con la organogénesis indirecta, siendo el sistema más usado para la obtención de plántulas de cultivos de importancia económica (Gaj, 2001, 2004; Zuo et al., 2002).

Para lograr la ES en las plantas, se requieren de ciertos factores que determinan directamente la obtención de embriones somáticos como son: el medio de cultivo, las condiciones ambientales, la especie y sus condiciones de cultivo y el explante utilizado. Sin embargo, no todas las especies presentan una respuesta satisfactoria a este proceso, como es el caso de *Coffea arabica*, que genera menor cantidad de embriones por explante en comparación con la especie *Coffea canefora*. Esto se debe a la presencia de compuestos de baja masa molecular y resistentes al calor. Estos compuestos son secretados por explantes de *C. arabica* al medio de cultivo (Nic-Can 2010; datos no publicados).

Por tanto, este descubrimiento dejó la siguiente pregunta ¿qué compuestos están presentes en la fracción de baja masa molecular y que son los causantes de la inhibición en la formación de la ES de *C. arabica*? Hasta la fecha se han identificado tres compuestos con un anillo aromático y la existencia de una cadena lateral sobre el anillo,

INTRODUCCIÓN

adyacente a la doble ligadura. Estos compuestos son la cafeína, el ácido *p*-hidroxibenzoato y el ácido trans-cinámico.

Por otro lado, y teniendo como base el potencial que presenta la ES para realizar estudios básicos del proceso embriogénico, en este proyecto de investigación se utilizó un cultivo embriogénico de *D. carota* para determinar la capacidad inhibitoria de los compuestos secretados por los explantes de *C. arabica* en el medio de cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

- Gaj M. D., Direct somatic embryogenesis as a rapid and efficient system for *in vitro* regeneration of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 64: 39-46, (2001).
- Gaj M. D., Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, *Plant Growth Regul.*, 43: 27-47, (2004).
- Krikorian A. D. and L. K. Simola, Totipotency, somatic embryogenesis, and Harry Waris (1893-1973), *Physiol. Plant.*, 105: 348-355, (1999).
- Quiroz-Figueroa F. R., R. Rojas-Herrera, R. M. Galaz-Avalos and V. M. Loyola-Vargas, Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 86: 285-301, (2006).
- Reinert J., Über die kontrolle der morphogenese und die induktion von adventivembryonen an gewebeulturen aus karotten, *Planta*, 53: 318-333, (1959).
- Steward F. C., M. O. Mapes and K. Mears, Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells, *Am. J. Bot.*, 45: 705-708, (1958).
- Tisserat B., Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration, in: *Plant Cell Culture. A Practical Approach*, (Dixon R. A., ed.), IRL Press, Oxford, 79-105, (1985).
- Zimmerman J. L., Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants, *Plant Cell*, 5: 1411-1423, (1993).
- Zuo J., Q. W. Niu, G. Frugis and N. H. Chua, The WUSCHEL gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*, *Plant J.*, 30: 349-359, (2002).

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1. Embriogénesis somática

El ciclo de vida de las especies fanerógamas incluyen dos fases: la fase gametofítica (haploide) y la fase esporofítica (diploide), por lo cual, la embriogénesis es crucial en el ciclo de vida de las plantas con flores. La fase esporofítica comienza con la doble fertilización que da como resultado la formación del embrión cigótico, es decir, la célula llamada cigoto sufre una serie de divisiones celulares que conllevan a la diferenciación de la célula para formar el embrión maduro. El proceso embriogénico ocurre en dos fases: la morfogénesis (donde se forma el cuerpo de la planta) y la maduración (donde el embrión entra en proceso metabólico para prepararse para la dormancia) para posteriormente, bajo condiciones adecuadas, se da la germinación de la semilla (Park y Harada, 2008; Quiroz-Figueroa et al., 2006).

Sin embargo, la embriogénesis no es exclusiva de los gametos. La ES fue descubierta en la década de los cincuentas (Krikorian y Simola, 1999; Reinert, 1959; Steward et al., 1958). La ES, es el proceso mediante el cual una célula somática vegetal, o un conjunto de células somáticas, bajo condiciones de inducción, sufre una restructuración celular y genera células embriogénicas mediante múltiples eventos morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares (expresión secuencial de diversos genes), que dan lugar a una estructura bipolar (embrión somático) y a la generación de una nueva planta. Si bien los procesos de la ES y la embriogénesis cigótica (EC) son activados por diferentes estímulos, en ambos procesos y en varias etapas durante el desarrollo de los embriones se produce la expresión de los mismos genes, por lo que se asume que ambos procesos convergen en la misma ruta de señalización, o por lo menos en parte de ella, muy probablemente durante los estadios tempranos (Komamine et al., 2005; Zhang et al., 2010).

Los embriones somáticos pueden desarrollarse directamente de las células competentes presentes en el explante o indirectamente después de pasar por una fase de callo, refiriéndose a la embriogénesis somática directa (ESD) y embriogénesis somática indirecta (ESI), respectivamente. Se cree que ambos procesos siguen un mismo camino

(Gaj, 2004; Sharp et al., 1980). Los embriones somáticos se originan mediante dos vías: unicelular (Quiroz-Figueroa et al., 2002) o multicelular (Raghavan, 1976), sin embargo, la pregunta si es de origen unicelular o multicelular está relacionada directamente con el comportamiento de las células. Cuando los embriones tienen un origen unicelular, las divisiones celulares son coordinadas y los embriones se observan unidos al explante por medio de un suspensor en la ESD (Williams y Maheswaran, 1986) y en la multicelular (ESI) las divisiones celulares son desorganizadas, por lo cual se observa inicialmente una protuberancia (callo), los embriones que se encuentran en la zona basimétrica se observan fundidos al tejido materno (Quiroz-Figueroa et al., 2006). Realizando estudios histológicos se ha logrado determinar que en algunas especies el origen del embrión es tanto unicelular (Trigiano et al., 1989) como multicelular (Fernandez et al., 1999; Taylor y Vasil, 1996) y en algunas especies se han logrado observar ambas vías durante la ESI (Fernandez et al., 1999) o ESD (Maheswaran y Williams, 1984; Trigiano et al., 1989). En la literatura científica existen un número considerable de artículos en los que se describe la manipulación de la ES para la obtención de plantas de importancia agronómica (Karami et al., 2008; Zimmerman, 1993), sin embargo, los resultados son aún ineficientes para algunas especies que presentan recalcitrancia a la ES.

2. Factores involucrados en la ES

Entre los factores involucrados en la ES se encuentran algunos inductores e inhibidores excretados en el medio de cultivo. Algunos de estos compuestos provienen de la pared celular, mientras que otros provienen del interior de la célula. Entre los inductores de la ES se encuentra una endoquitinasa ácida de 32 kDa que permite la terminación del desarrollo del embrión somático en la mutante *ts11* de *D. carota* en condiciones de estrés térmico, esta mutante produce embriones normalmente a 24 °C, sin embargo, al aumentar la temperatura a 32 °C el desarrollo de los embriones se detiene en el estadio globular. Cuando se le adiciona al medio de cultivo esta proteína se restablece la ES y permite la formación del protodermo y el desarrollo del embrión a 32 °C (De Jong et al., 1992).

Otro factor que interviene en la ES son las arabinogalactoproteínas (AGPs). Estas proteínas han sido determinadas en zanahoria (Chapman et al., 2000; Kreuger y Van Holst, 1995; Kreuger y Van Holst, 1993; Samaj et al., 2008; Stacey et al., 1990), en *Anacardium occidentale* (Pereira-Netto et al., 2007), un híbrido de *Chicorium* (Chapman et

al., 2000). La diferenciación de embriones somáticos de *Zea mays* derivados de microesporas también mejora cuando se adicionan AGPs al medio de cultivo (Borderies et al., 2004). El uso de técnicas de tinción inmunológicas en cultivos embriogénicos de *Abies alba X cephalonica* ha permitido descubrir que las AGPs se acumulan en la periferia de los embriones y de las células del suspensor (Samaj et al., 2008). Estos resultados sugieren que las AGPs juegan un papel preponderante durante la inducción y desarrollo de la ES.

Otro inductor de la ES es la glucoproteína identificada como una peroxidasa de 38 kDa encontrada en los exudados del medio de cultivo de suspensiones celulares de zanahoria (Cordewener et al., 1991). Cuando se agrega tunikamicina (un inhibidor de la glucosilación de las proteínas) a los medios de cultivo, ésta inhibe la ES. Cuando se agrega la peroxidasa, previamente purificada del medio de cultivo, se restaura la ES (Cordewener et al., 1991).

También se han determinado una variedad de moléculas que son secretadas al medio de cultivo y que inhiben la ES. Hasta el momento se han identificado dos compuestos de baja masa molecular: el alcohol 4-hidroxibencilo de 3.5 kDa responsable de la inhibición de la ES a altas densidades celulares (Kobayashi et al., 1999, 2000b, 2001, 2003) (Kobayashi et al., 2000a) y el vanilil bencil éter que inhibe el desarrollo del suspensor en *Larix leptolepis* (Umehara et al., 2005, 2007). Más recientemente en el equipo de trabajo del Centro de Investigación científica de Yucatán dirigido por el doctor Loyola-Vargas pudo determinar que se puede inhibir el proceso embriogénico en *D. carota* y *C. canephora* al adicionarle la fracción de baja masa molecular procedente del medio de cultivo condicionado de *C. arabica*. De la fracción de baja masa molecular procedente del medio condicionado de *C. arabica* se pudieron identificar cafeína, el ácido *p*-hidroxibenzoico y el ácido trans-cinámico (Nic-Can et al., en preparación).

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto inhibitorio en la embriogénesis somática de *D. carota* de los compuestos secretados por los explantes de *Coffea arabica*.

CAPÍTULO I

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Establecer y caracterizar una línea de callos de *D. carota*.

Establecer y caracterizar una línea de *D. carota* en suspensión.

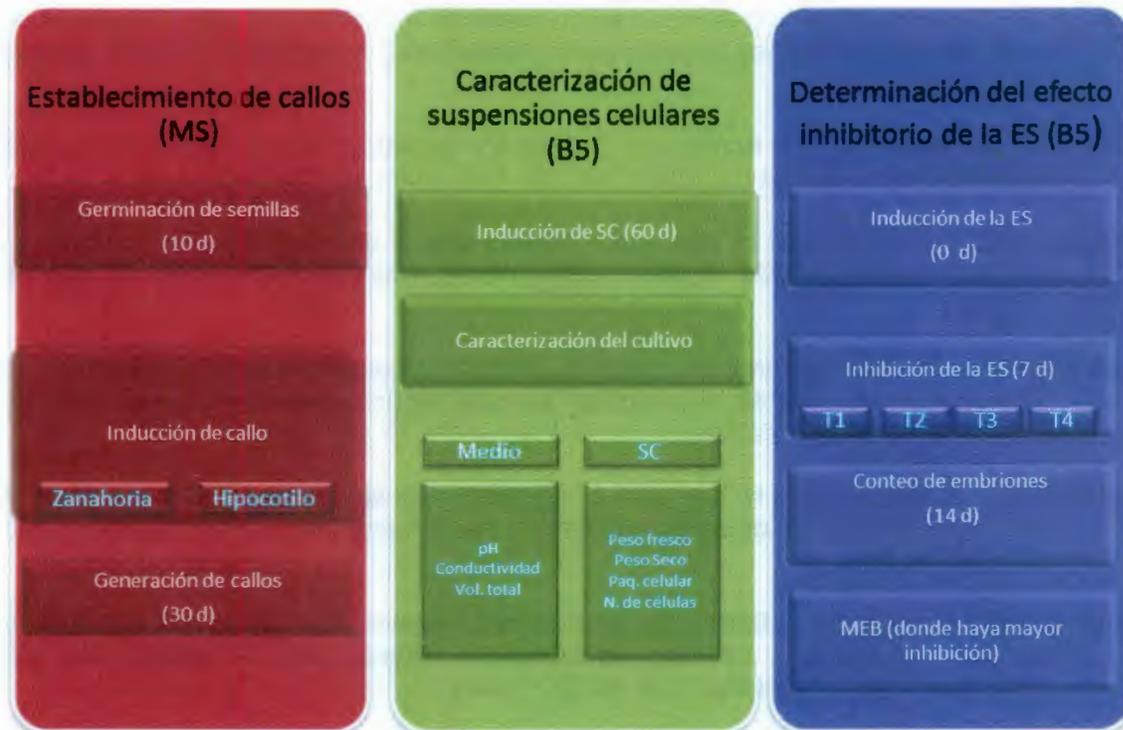
Establecer un sistema de embriogénesis somática en *D. carota*.

Determinar el efecto inhibitorio de los ácidos trans-cinámico, *p*-hidroxibenzoico y cafeína en la embriogénesis somática de *D. carota*.

JUSTIFICACIÓN

La ES es una herramienta muy útil en el estudio de los eventos morfológicos, fisiológicos, moleculares y bioquímicos que ocurren en el inicio y desarrollo de la embriogénesis en las plantas superiores. Esta técnica requiere de ciertos factores como son el medio de cultivo, las condiciones ambientales de incubación de los explantes y el explante utilizado para la obtención de embriones somáticos, sin embargo, la especie de *Coffea arabica* no produce embriones somáticos, debido a que sus explantes foliares secretan en el medio de cultivo, compuestos de baja masa molecular y resistentes al calor, que causan la inhibición en la embriogénesis somática. Se identificaron tres compuestos, que hipotéticamente pudieran ser los responsables de este efecto. Por lo cual, se utilizarán los compuestos identificados para observar el efecto de cada uno en la ES de *D. carota*.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



BIBLIOGRAFÍA

- Borderies G., M. le Behec, M. Rossignol, C. Lafitte, E. Le Deunff, M. Beckert, C. Dumas and E. Matthys-Rochon, Characterization of proteins secreted during maize microspore culture: arabinogalactan proteins (AGPs) stimulate embryo development, *Eur. J. Cell Biol.*, 83: 205-212, (2004).
- Chapman A., A. S. Blervacq, J. Vasseur and J. L. Hilbert, Arabinogalactan-proteins in *Cichorium* somatic embryogenesis: effect of b-glucosyl Yariv reagent and epitope localisation during embryo development, *Planta*, 211: 305-314, (2000).
- Cordewener J., H. Booij, H. Van der Zandt, F. A. Van Engelen, A. Van Kammen and S. C. De Vries, Tunicamycin-inhibited carrot somatic embryogenesis can be restored by secreted cationic peroxidase isoenzymes, *Planta*, 184: 478-486, (1991).
- De Jong A. J., J. Cordewener, F. Lo Schiavo, M. Terzi, J. Vandekerckhove, A. Van Kammen and S. C. De Vries, A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase, *Plant Cell*, 4: 425-433, (1992).

CAPÍTULO I

- Fernandez S., N. Michaux-Ferrière and M. Coumans, The embryogenic response of immature embryo cultures of durum wheat (*Triticum durum* Desf.): histology and improvement by AgNO₃, *Plant Growth Regul.*, 28: 147-155, (1999).
- Gaj M. D., Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, *Plant Growth Regul.*, 43: 27-47, (2004).
- Karami O., A. Deljou and G. Kordestani, Secondary somatic embryogenesis of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 92: 273-280, (2008).
- Kobayashi T., K. Higashi and H. Kamada, inhibitory effects of p-hydroxybenzyl alcohol on somatic embryogenesis in carrot cell cultures, *Plant Biotechnology*, 17: 87-92, (2000a).
- Kobayashi T., K. Higashi and H. Kamada, 4-Hydroxybenzyl alcohol accumulates in suspension-cell cultures and inhibits somatic embryogenesis in carrot, *Physiol. Plant.*, 112: 280-284, (2001).
- Kobayashi T., K. Higashi and H. Kamada, 4-Hydroxybenzyl alcohol accumulates in flowers and developing fruits of carrot and inhibits seed formation, *J. Plant Physiol.*, 160: 713-716, (2003).
- Kobayashi T., K. Higashi, T. Saitou and H. Kamada, Physiological properties of inhibitory conditioning factor(s), inhibitory to somatic embryogenesis, in high-density cell cultures of carrot, *Plant Sci.*, 144: 69-75, (1999).
- Kobayashi T., K. Higashi, K. Sasaki, T. Asami, S. Yoshida and H. Kamada, Purification from conditioned medium and chemical identification of a factor that inhibits somatic embryogenesis in carrot, *Plant Cell Physiol.*, 41: 268-273, (2000b).
- Komamine A., N. Murata and K. Nomura, Mechanisms of somatic embryogenesis in carrot suspension cultures - morphology, physiology, biochemistry, and molecular biology, *In Vitro Cell. Dev. Biol. -Plant*, 41: 6-10, (2005).
- Kreuger M. and G. Van Holst, Arabinogalactan-protein epitopes in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L., *Planta*, 197: 135-141, (1995).
- Kreuger M. and G. J. Van Holst, Arabinogalactan proteins are essential in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L., *Planta*, 189: 243-248, (1993).
- Krikorian A. D. and L. K. Simola, Totipotency, somatic embryogenesis, and Harry Waris (1893-1973), *Physiol. Plant.*, 105: 348-355, (1999).
- Maheswaran G. and E. G. Williams, Direct somatic embryo formation on immature embryos of *Trifolium repens*, *T. pratense* and *Medicago sativa*, and rapid clonal propagation of *T. repens*, *Ann. Bot.*, 54: 201-211, (1984).
- Park S. and J. J. Harada, *Arabidopsis* embryogenesis, in: *Plant Embryogenesis*, (Suárez

- M. F. and P. V. Bozhkov, eds.), Humana Press, Totowa, 3-16, (2008).
- Pereira-Netto A. B., F. Pettolino, C. T. A. Cruz-Silva, F. F. Simas, A. Bacic, A. M. d. A. Carneiro-Le+úo, M. Iacomini and J. B. B. Maurer, Cashew-nut tree exudate gum: Identification of an arabinogalactan-protein as a constituent of the gum and use on the stimulation of somatic embryogenesis, *Plant Sci.*, 173: 468-477, (2007).
- Quiroz-Figueroa F. R., C. F. J. Fuentes-Cerda, R. Rojas-Herrera and V. M. Loyola-Vargas, Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*, *Plant Cell Rep.*, 20: 1141-1149, (2002).
- Quiroz-Figueroa F. R., M. Monforte-González, R. M. Galaz-Avalos, and V. M. Loyola-Vargas, Direct somatic embryogenesis in *Coffea canephora*, in: Plant cell culture protocols, (Loyola-Vargas V. M. and F. A. Vázquez-Flota, eds.), Humana Press, Totowa, New Jersey, 111-117, (2006).
- Raghavan V., Experimental Embryogenesis in Vascular Plants, Academic Press, London, (1976).
- Reinert J., Über die kontrolle der morphogenese und die induktion von adventivembryonen an gewebeulturen aus karotten, *Planta*, 53: 318-333, (1959).
- Samaj J., T. Salaj, R. Matusova, J. Salaj, T. Takac, O. G. Samajova and D. Volkman, Arabinogalactan-protein epitope Gal4 is differentially regulated and localized in cell lines of hybrid fir (*Abies alba* x *Abies cephalonica*) with different embryogenic and regeneration potential, *Plant Cell Rep.*, 27: 221-229, (2008).
- Sharp W. R., M. R. Söndahl, L. S. Caldas and S. B. Maraffa, The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis, *Horticul. Rev.*, 268-310, (1980).
- Stacey N. J., K. Roberts and J. P. Knox, Patterns of expression of the JIM4 arabinogalactan-protein epitope in cell cultures and during somatic embryogenesis in *Daucus carota* L., *Planta*, 180: 285-292, (1990).
- Steward F. C., M. O. Mapes and K. Mears, Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells, *Am. J. Bot.*, 45: 705-708, (1958).
- Taylor M. G. and I. K. Vasil, The ultrastructure of somatic embryo development in pearl millet (*Pennisetum glaucum*; Poaceae), *Am. J. Bot.*, 83: 28-44, (1996).
- Trigiano R. N., D. J. Gray, B. V. Conger and J. K. McDaniel, Origin of direct somatic embryos from cultured leaf segments of *Dactylis glomerata*, *Bot. Gaz.*, 150: 72-77, (1989).
- Umehara M., S. Ogita, H. Sasamoto, H. Koshino, T. Asami, S. Fujioka, S. Yoshida and H. Kamada, Identification of a novel factor, vanillyl benzyl ether, which inhibits somatic embryogenesis of Japanese larch (*Larix leptolepis* Gordon), *Plant Cell Physiol.*, 46:

CAPÍTULO I

445-453, (2005).

Umehara M., S. Ogita, H. Sasamoto, H. Koshino, T. Nakamura, T. Asami, S. Yoshida and H. Kamada, Identification of a factor that complementarily inhibits somatics embryogenesis with vanillyl benzyl ether, *In Vitro Cell. Dev. Biol. -Plant*, 43: 203-208, (2007).

Williams E. G. and G. Maheswaran, Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group, *Ann. Bot.*, 57: 443-462, (1986).

Zhang N., W. Fang, Y. Shi, Q. Liu, H. Yang, R. Gui and X. Lin, Somatic embryogenesis and organogenesis in *Dendrocalamus hamiltonii*, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 103: 325-332, (2010).

Zimmerman J. L., Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants, *Plant Cell*, 5: 1411-1423, (1993).

CAPÍTULO II

Estudio de la inhibición de la ES en *D. carota* por compuestos fenólicos

2.1. INTRODUCCIÓN

La adquisición de la totipotencia es el paso más crítico en la embriogénesis somática y el factor más importante que le afecta, es la aplicación de reguladores de crecimiento, debido a que el uso de auxinas a altas concentraciones es necesario para causar la desdiferenciación y la estimulación de la totipotencia, como son el 2,4-D, el cual es un elemento químico que es usado como un análogo de auxinas que al ser añadido al medio de cultivo las células desatan una cascada de señales que implican cambios en la expresión génica para dar origen a los embriones y esta cascada de estimulan una rápida y sincronizada división celular, dando lugar a la presencia de células proembriogénicas y por ende una proliferación de estas células (Litz et al., 1993, Zimmerman, 1993, Xing et al., 2000, Cooke, et al, 2002, Yang and Zhang, 2010).

La ES de *D. carota* es altamente eficiente y reproducible cuando es eliminado el 2,4D del medio de cultivo, por ello se usó como modelo de estudio para analizar el efecto de la inhibición de la ES, con el ácido cinámico, ácido parahidroxibenzoico y cafeína (1, 10, 100 y 1000 μM) a tres diferentes días de inducción (5, 7 y 9), con el fin de conocer si estos compuestos encontrados en el medio de cultivo condicionado de baja masa molecular, tienen un efecto similar a lo reportado en la embriogénesis somática de *C. canephora*.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Germinación de las semillas

Las semillas de *D. carota* se lavaron con detergente de 30 a 40 minutos, manteniéndose en agitación en una placa de calentamiento, después las semillas se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se transfirieron a un vaso de precipitados estéril que contenía alcohol al 70% (v/v) durante 30 segundos y se dieron tres lavados con agua estéril. Seguidamente las semillas se sumergieron durante 15 minutos en 1% de (v/v) de hipoclorito de sodio. Posteriormente, las semillas se lavaron cinco veces con agua estéril y se colocaron siete semillas en una caja magenta que contenía medio MS (Murashige y

CAPÍTULO II

Skoog, 1962) a la mitad de la fuerza iónica suplementado con 3% sacarosa (p/v) y agar al 0.8% (p/v), se llevaron al cuarto de cultivo y se incubaron a 22 °C en la oscuridad. Se realizó un seguimiento por medio de estereoscopio desde la siembra de la semilla hasta que se obtuvieron hipocotilos de 10 días de edad.

2.2.2. Generación de callo del tubérculo

Tubérculo de zanahoria: se eligieron zanahorias sin daños de 3 a 5 cm de diámetro y se lavaron muy bien con agua del grifo, se eliminaron un cm de la parte superior y dos cm de la parte inferior de la zanahoria y se desecharon ambos cortes. Posteriormente, del tubérculo, de aproximadamente 7 cm se cortó transversalmente. A partir de ese momento se trabajó en una campana de flujo laminar bajo condiciones asépticas y las láminas de 7 cm se sumergieron en 500 ml de una solución de hipoclorito de sodio al 2% (v/v) durante 25 minutos. Las láminas se transfirieron a un vaso de precipitado con 100 ml de agua estéril y se lavaron tres veces a intervalos de 5, 10 y 15 minutos, seguidamente se transfirió uno de los segmentos a papel filtro para cortar un cm de espesor de ambos extremos con un cuchillo estéril y cortar transversalmente rodajas de un mm de espesor y colocarlas en una caja de Petri que contenga papel filtro humedecido con agua estéril, se colocó una rebana y se obtuvieron de dos a tres explantes esperando que contenga cambium vascular (xilema y floema). Se transfirieron cinco explantes por caja de Petri conteniendo medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 3% sacarosa (p/v) y agar al 0.8% (p/v) y se llevaron al cuarto de cultivo e incubaron a 25 °C en la oscuridad. Se examinaron la formación de callos a los 7 y 14 días y 21 días de cultivo con la ayuda de un estereoscopio y a los 30 días de cultivo se seleccionaron los mejores callos y se transfirieron a medio fresco para obtener el material biológico necesario para los experimentos.

2.2.3. Inducción de suspensiones celulares

Para la generación de la línea en suspensión se usaron callos de cuatro o cinco semanas de edad y se inocularon 2.0 g de callo y se colocaron en un matraz Elenmeyer de 250 mL que contenía 50 mL de medio B5 (Gamborg y Eveleigh, 1968) suplementado con 3% de sacarosa, 4.5 μ M de 2-4 D. Los cultivos se llevaron a un cultivo en un orbitador New Brunswick Scientific modelo G-53, en fotoperiodo 16/8 h (luz/oscuridad) y agitándose a 100 rpm durante 10 días. Para estimular el desarrollo embrionario se colectaron los

cultivos en suspensión y se filtraron a través de un filtro Milipore y las suspensiones se subcultivaron cada dos semanas.

Otra técnica para obtener las suspensiones celulares fue a partir de hipocotilos de 10 días de edad. Alrededor de 2 g de tejido de hipocotilo se añadieron a 50 mL de medio líquido B5 (Gamborg y Eveleigh, 1968) suplementado con 3% de sacarosa, 2 μ M de 2-4 D en frascos de 250 mL. Los cultivos se incubaron a 23 °C con un fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad) a 100 rpm. Diecinueve días después se retiraron los hipocotilos del medio de cultivo. A partir de ese momento las suspensiones celulares se subcultivaron cada dos semanas (De Vries et al., 1988). Se realizó un seguimiento del aumento de la densidad de las suspensiones a los 0, 7, 14 y 21 días.

2.2.3.1. Caracterización de las suspensiones celulares

El primer paso en un estudio bioquímico es la caracterización de las suspensiones celulares, en donde se estableció un ciclo de cultivo con suspensiones celulares de 14 días de cultivo; en primera instancia las células se tamizaron obteniendo un tamaño homogéneo de células, una vez realizado este paso se filtraron de nuevo las células en papel filtro aplicándole vacío para poder eliminar el medio de cultivo. Una vez filtradas las células se pesaron 0.25 g del inóculo inicial y se depositaron en 25 mL de medio de cultivo líquido B₅ en matraces Erlenmeyer con capacidad de 125 mL. Las suspensiones celulares se colocaron a 25 °C, en un orbitador New Brunswick Scientific modelo G-53, en fotoperiodo con 16/8 horas de luz y oscuridad, agitándose a 100 rpm. Se realizaron dos muestreos en días pares (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24) y días nones (1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 18, 21, 24) tomando tres matraces Erlenmeyer por cada día de muestreo. El medio de cultivo recolectado fue filtrado en membranas de nylon de 0.45 μ m. Una vez filtrado el medio de cultivo de cada matraz se tomaron en cuenta los parámetros de crecimiento: como el peso fresco, peso seco de las suspensiones celulares, así como también el volumen final del medio de cultivo al cual se le midió el pH y la conductividad.

2.2.3.1.1. Volumen final del medio de cultivo

Se midió el volumen final de cada matraz con la ayuda de una probeta con capacidad de 25 mL; del volumen total del medio de cultivo se tomó 1 ml por triplicado por cada matraz para poder contar el número de células.

CAPÍTULO II

2.2.3.1.2. pH

El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.7 antes de esterilizar; después de esterilizar se midió el pH inicial del medio de cultivo para poder apreciar la variabilidad a través del ciclo de cultivo de las suspensiones celulares de *D. carota*.

2.2.3.1.3. Conductividad

Este parámetro se midió de manera similar al pH, y sirvió para poder determinar la toma de los nutrientes del medio de cultivo de las suspensiones celulares de *D. carota*.

2.2.3.1.4. Peso fresco

Las suspensiones se filtraron con la ayuda de un embudo Büchner, una vez teniendo las suspensiones celulares en el filtro se pesaron en una balanza analítica Scientech modelo SL 400, seguidamente las células se envolvieron en papel aluminio y se guardaron a -80 °C.

2.2.3.1.5. Peso seco

Una vez que se congelaron las muestras conteniendo las células se liofilizaron para eliminar el agua del tejido y se pesaron en una balanza analítica Scientech modelo SL 400 poder determinar el peso seco, es decir, el crecimiento real de las raíces.

2.2.3.1.6. Volumen de paquete celular

Se tomaron 10 ml de la suspensión celular y se colocaron en tubos graduados y se centrifugaron a 3,500 rpm durante 15 minutos (Beckmann). El volumen de paquete celular es expresado en porcentaje por mililitro.

$$\text{Porcentaje de volumen celular} = \frac{\text{Volumen obtenido}}{\text{Volumen utilizado}} \times 100$$

2.2.3.1.7. Número de células

Para poder contabilizar las células se requiere de la separación de los agregados celulares. Por lo cual, se toma 1 ml de la suspensión celular del matraz a muestrear antes de determinar el peso fresco. El tubo que contiene el mililitro de la suspensión celular se mezcla con 2 ml de trióxido de cromo al 8% y se dejan por 15 minutos a 75 °C.

Transcurrido este tiempo se agitan vigorosamente durante 10 minutos para separar los agregados celulares. Seguidamente las muestras se colocaron en una cámara de Neubauer y se contabilizaron las células de cada muestra. El muestro se hizo por triplicado.

2.2.4. Inducción de ES a partir de suspensiones celulares

Alrededor de ocho semanas después del inicio de las suspensiones celulares se obtuvieron embriones somáticos. La formación de embriones se indujo por la selección de las células y agregados celulares a través de malla de 50 μm de nylon, de las cuales se tomaron 40 ml y se centrifugaron a 3,000 rpm durante 5 minutos, seguidamente se elimina el sobrenadante y se lavan con medio líquido B5 (Gamborg y Eveleigh, 1968) libre de la auxina, este paso se realiza tres veces para obtener 5 ml de paquete celular, seguidamente el volumen del paquete celular se diluyó en 12.5 ml de medio líquido B₅ libre de la auxina, suplementado con 3% de sacarosa, se tomó una alícuota de 50 μl para depositarse en matraces Elenmayer con capacidad de 250 mL libre de auxinas (De Vries et al., 1988).

2.2.5. Evaluación del efecto inhibitorio mediante un estudio dosis-respuesta

Una vez obtenida la densidad necesaria de las suspensiones celulares de 7 días de subcultivo, se indujo la ES de *D. carota* en medio de cultivo líquido B₅ libre de la auxina en matraces Erlenmeyer con capacidad de 250 ml. Las suspensiones se colocaron a 25 °C, en un orbitador New Brunswick Scientific modelo G-53, en fotoperiodo 16/8 h (luz/oscuridad) y se agitaron a 100 rpm y a los 7 días de inducir la ES se indujo la inhibición con tres compuestos (cafeína, ácido *p*-hidroxibenzoico y ácido cinámico) a diferentes concentraciones (0, 10, 100 y 1000 μM). Los parámetros a evaluar fue el tipo de inhibición que causa cada uno de los compuestos y la concentración de estos compuestos a la que producen la inhibición.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Germinación de semillas

Como se puede observar en la figura 2.1 las semillas que se sembraron no se contaminaron, por lo cual el proceso de desinfestación fue exitoso. Por otro lado, en la

CAPÍTULO II

figura 2.2 se puede observar que las semillas conservaron su viabilidad después del tratamiento de desinfección. El 90% de las semillas germinaron alrededor del tercer día después de su siembra. El criterio seguido fue la emergencia de la raíz. Se pudo realizar un seguimiento desde la siembra de las semillas hasta la obtención de las plántulas para la obtención de los hypocotilos que se usaron para obtener las suspensiones celulares.



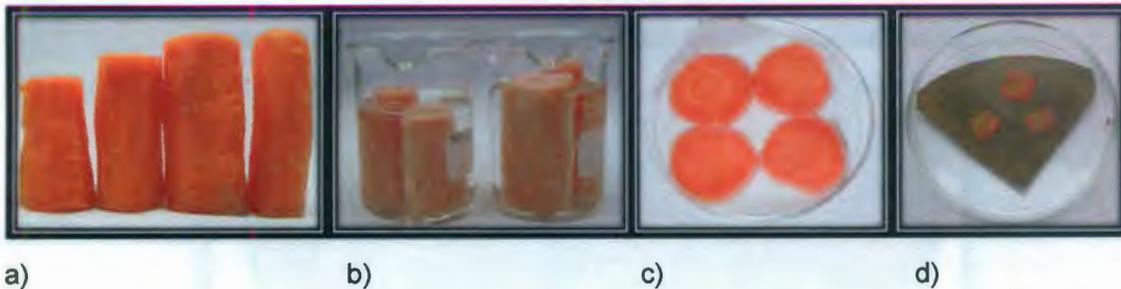
a) b) c) d)
Figura 2.1. Desinfección y siembra de semillas de *D. carota*. a) Lavado de semillas con detergente 40 min. b) Lavados con etanol al 70% e hipoclorito de sodio al 1%. c) Siembra de 7 semillas por caja magenta. d) Visualización de la semilla a través del estereoscopio.



a) b) c) d)
Figura 2.2. Obtención de plantas de *D. carota*. a) Cero días, b) Plántula de 7 días. c) Plántulas de 14 días. d) Plántulas de 21 días de edad.

2.3.2. Generación de callos del tubérculo

Para la obtención de callos a partir de tubérculos de zanahoria se siguió la metodología de Hall (1991). En la figura 2.3 se puede apreciar toda la metodología que se describió con anterioridad. También se siguió la generación de los callos por medio del estereoscopio, realizando observaciones a los 0, 7 14 y 21 días. A los 21 días se separaron los callos del explante original y se depositaron en medio fresco para la propagación de callo.



a)

b)

c)

d)

Figura 2.3. Asepsia de tubérculos de zanahoria. a) Eliminación de impurezas de la zanahoria. b) Lavados con hipoclorito de sodio al 1%. c) Cortes transversales que contienen cambium vascular. d) Obtención de los explantes.



Figura 2.4. Obtención de callos de *D. carota* después de tres semanas de inducción en el medio B₅ basal suplementado con 3% de sacarosa y 4.5 μ M de 2-4 D. Los números representan días.

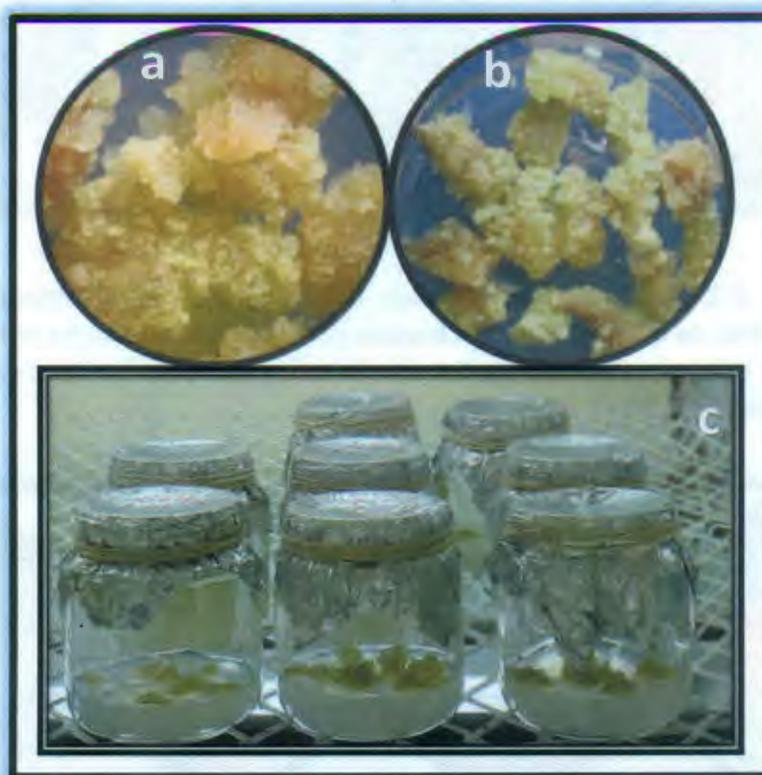


Figura 2.5. Línea de callos proveniente del tubérculo de zanahoria. a) Vista de los callos a través del estereoscopio. b) Vista superior de los callos obtenidos después de 140 días posterior a la inducción. c) Mantenimiento de la línea de callos del tubérculo de zanahoria en medio líquido B₅ basal suplementado con 3% de sacarosa y 4.5 µM de 2-4 D.

2.3.3. Inducción de las suspensiones celulares

Se realizó un seguimiento de la obtención de las suspensiones celulares desde la inoculación del callo en el día 0 hasta los 42 días después de la inducción (Fig. 2.6). En el primer subcultivo (día 14) se observó que existe un desprendimiento de las células libres, sin embargo, la división celular de estas células es casi nula, por lo cual se dejaron los grumos de callo inoculado inicialmente y se realizaron dos subcultivos, a los 28 y 42 días. A los 28 días posteriores a la inducción, como se puede observar en la figura 2.6, células libres y cúmulos de callos que fueron creciendo conforme se fueron subcultivando: Los callos iniciales se dejaron en el medio por 14 días para que pudieran desprender más células al medio de cultivo. A los 42 días de haber iniciado la inducción de las suspensiones celulares los agregados celulares muy grandes y el callo que se inoculó en

el día 0 se tamizaron con la ayuda de una malla de acero inoxidable con el propósito de tener una línea con un crecimiento celular constante después de cada subcultivo y evitar la acumulación de células muertas y moléculas que se secretan al medio de cultivo que pueden ser tóxicas para las células que se están dividiendo constantemente.

Después de los 42 días se obtuvo la línea celular ya finamente tamizada y de ahí se subcultivó cada 14 días para obtener la densidad necesaria para realizar los experimentos de inhibición. El día óptimo para el subcultivo de la línea establecida es a los 14 días (Fig. 2.7) ya que en este día se observa mayor densidad de células vivas que a los 28 días cuando ya existe una combinación de células muertas y vivas, lo cual afecta la división celular de las más jóvenes debido a que ya las células secretan sustancias al medio de cultivo que pudieran ser tóxicas para las nuevas células.



Figura 2.6. Inducción de suspensiones celulares de *D. carota* provenientes de tubérculos de zanahoria desde el día 0 hasta los 42 días después de su inducción. El medio de cultivo se renovaba cada 14 días.

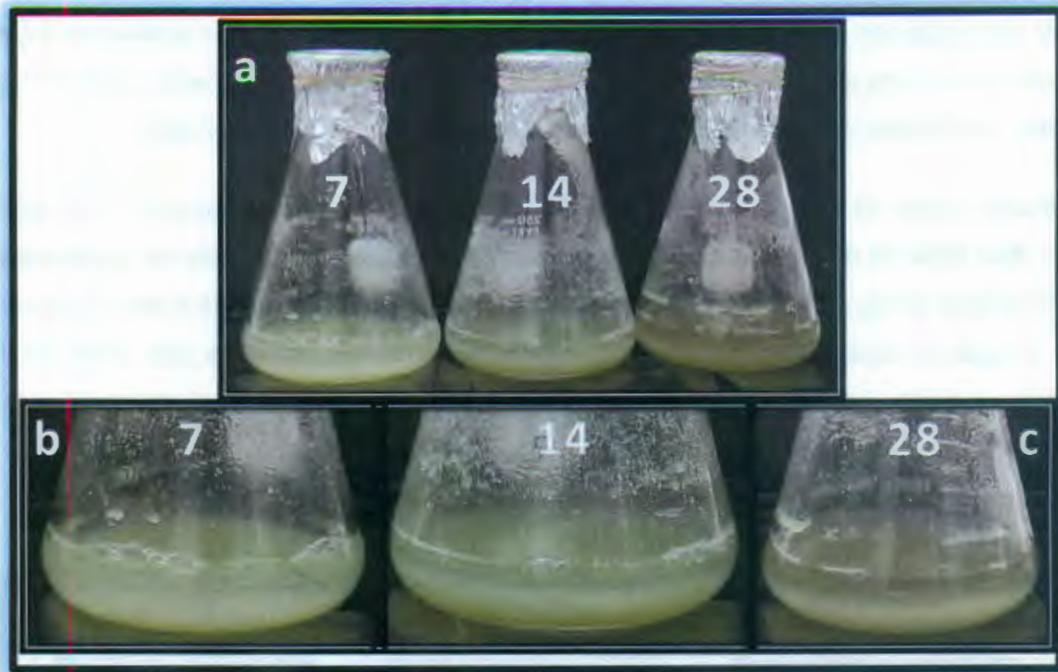


Figura 2.7. Obtención de una línea celular compuesta por células finas y con una rápida división celular. a) En el panel a se puede observar el aumento de densidad con el paso de los días de cultivo y en el panel b) se realizó un acercamiento y se observa que del día 14 al 28 la línea celular decae.

2.3.3.1. Caracterización de las suspensiones celulares

Las suspensiones celulares son generalmente sistemas heterótrofos, donde el crecimiento y el metabolismo dependen de la disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo. Una vez ya obtenida la suspensión celular densa formada por aglomerados celulares de color beige con una rápida división celular, se procedió a caracterizar la línea generada en la cual se tomaron en cuenta diferentes parámetros para determinar su crecimiento y división celular que se describen a continuación.

2.3.3.1.1. pH del medio de cultivo

Este parámetro es indispensable para conocer como las suspensiones celulares van tomando las diferentes fuentes de nitrógeno que se encuentran presentes en el medio de cultivo, ya que se sabe que las células absorben el nitrógeno en sus formas inorgánicas NO_3^- (nitrato) y NH_4^+ (amonio) dando lugar a variaciones en el pH, debido a que la

absorción de NO_3^- produce una alcalinización del medio de cultivo por la liberación de iones OH^- (hidroxilo), en tanto que la absorción de NH_4^+ produce la acidificación del medio de cultivo, puesto que las células liberan al medio de cultivo H^+ (protones) cuando toman el amonio, haciendo que haya una variación en el pH en el medio de cultivo a lo largo un ciclo de crecimiento.

En la figura 2.8 se puede apreciar la fluctuación en el pH durante el transcurso de 24 días. Se puede observar que del día 0 al día 3 el pH sufrió un ligero aumento esto puede ser debido a que las células que se añadieron están adaptándose, sin embargo a los 3 días el pH disminuyó hasta alrededor de 5.4 el día 9. A partir de este día el pH aumentó hasta llegar a tener un pH de 7.1 el día 24. Estos cambios en el pH muestran un comportamiento típico de los cultivos celulares en los que primero se acidifica el pH del medio y después se alcaliniza. Esto se debe, como ya se mencionó a la toma de la fuente nitrogenada (Martin et al., 1977; Moreno-Valenzuela et al., 1999; Veliky y Rose, 1973). Estas variaciones presentan diferencias significativas con una $p > 0.9$.

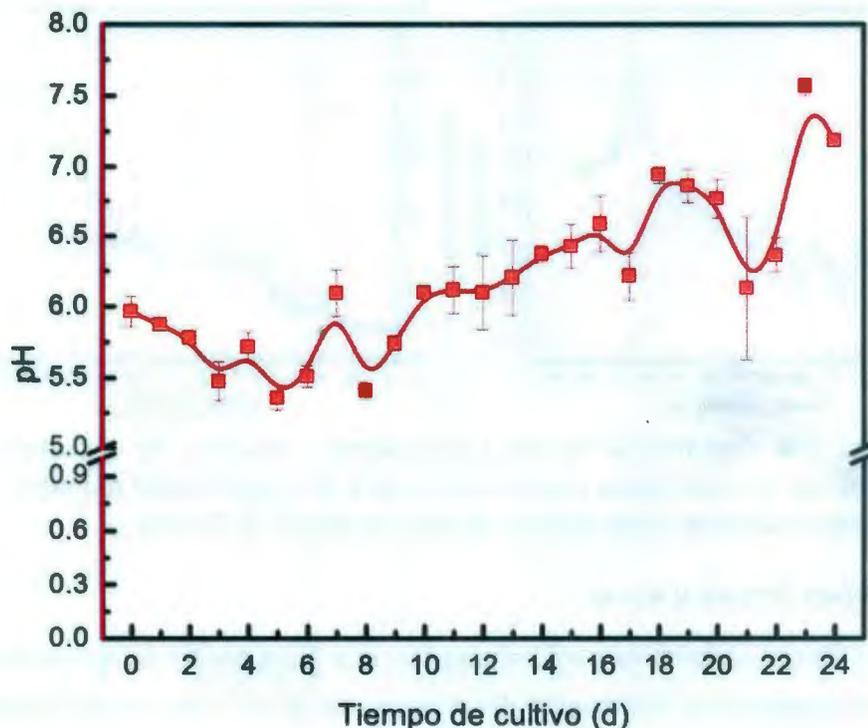


Figura 2.8. Comportamiento del pH del medio de las suspensiones celulares de *D. carota* durante el ciclo de cultivo de 24 días.

CAPÍTULO II

2.3.3.1.2. Conductividad

La conductividad eléctrica del medio de cultivo es un parámetro muy importante para poder determinar la toma o consumo de los nutrientes presentes en el del medio de cultivo, implicando el crecimiento de las células y el aumento de la biomasa (Hahlbrock et al., 1974; Hahlbrock y Kuhlen, 1972; Kwok et al., 1992; Taya et al., 1989). La conductividad del medio de cultivo se midió a lo largo de un ciclo de cultivo de las suspensiones celulares de *D. carota* durante 24 días. En la figura 2.9, en los paneles A y B, se muestra que la conductividad del medio de cultivo es inversamente proporcional al crecimiento, medido como el aumento en pesos fresco y seco respectivamente, ya que la conductividad del medio va disminuyendo con el paso de los días y el peso fresco/seco va en aumento, teniendo un punto de intersección en el día 17 con una conductividad de 4.81 y 0.8 y 0.08 g de peso fresco/seco respectivamente. Se sabe que la conductividad del medio está dada mayormente por el contenido de nitrato presente en el medio de cultivo (Hahlbrock et al., 1974; Hahlbrock y Kuhlen, 1972).

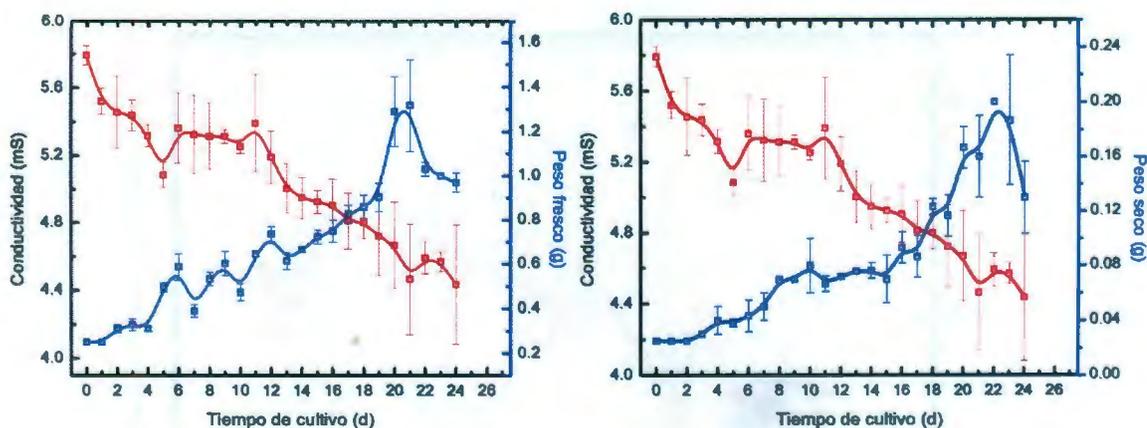


Figura 2.9. Crecimiento de las suspensiones celulares de *D. carota* estimando el peso fresco (cuadros azules) y la conductividad del medio de cultivo (cuadros rojos) durante el ciclo de cultivo de 24 días.

2.3.3.1.3. Pesos fresco y seco

Dentro de los parámetros para caracterizar una línea celular se encuentra el peso fresco, el cual proporciona información del aumento de la biomasa de las suspensiones celulares que está dado por la división celular (implica la síntesis de materia orgánica y la asimilación de nutrientes) y la elongación determinada por la entrada de agua al tejido.

Sin embargo, el peso fresco tiende a tener mucha variación debido a diferentes factores, particularmente la dificultad de eliminar el agua que se encuentra fuera de las células, por lo que se prefiere la medida del peso seco. En la figura 2.10 se muestra el peso fresco (0.25 g) y el peso seco (0.025 g) en el día 0. El contenido de agua de las células de zanahoria es del 90%. Por tanto, con la medida del peso seco se pudo comprobar el aumento de la biomasa de las suspensiones celulares conforme van pasando los días de cultivo; los cultivos alcanzan un peso máximo alrededor del día 21 con 1.31 g para el peso fresco y 0.2 g en el día 22 para el peso seco.

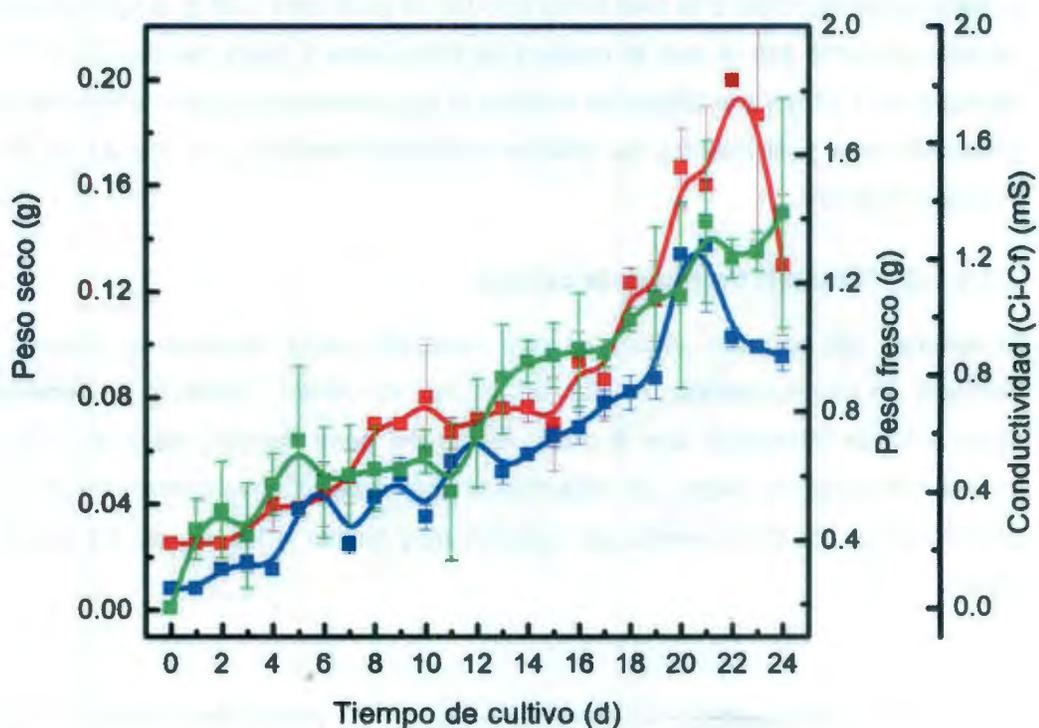


Figura 2.10. Crecimiento de las suspensiones celulares de *D. carota* estimando el peso fresco (cuadros verdes), peso seco (cuadros rojos) y la conductividad del medio de cultivo (cuadros azules) durante el ciclo de cultivo de 24 días.

Por otro lado, con base a los datos obtenidos se pudo obtener el índice de crecimiento de las suspensiones fue de 0.2919 con un tiempo de duplicación de 2.37 d. En la figura 2.10 se muestra la correlación que existe entre la conductividad, conductividad inicial (C_i) menos la conductividad final (C_f) del medio de cultivo, el peso fresco y el peso seco, llegándose a observar una tendencia muy similar entre estos tres

parámetros medidos. Por ello se puede concluir que las suspensiones celulares están tomando los nutrimentos del medio y por ende aumentando su crecimiento y su biomasa

En esta misma grafica se pueden observar las distintas fases de crecimiento de una suspensión celular con referencia al peso fresco. La primera es la fase de adaptación (en la que las células crecen lentamente y se preparan para dividirse) que se da del día 0 al día 4 llegando a una biomasa de 0.31 g< seguidamente se observa la fase exponencial (en la que se da la máxima división celular) del día 4 al día 14 con un incremento de 0.66 g, para luego dar lugar a la fase lineal del día 14 al 20 con 1.29 g, posteriormente la fase de retardamiento (en la que la división se hace lenta y baja) del día 20 al 21 con una biomasa de 1.31 g y por último se observa la fase estacionaria (el crecimiento se detiene completamente y el número de células comienza disminuir) del día 22 al 24 con una biomasa de 0.97g.

2.3.3.1.4. Volumen de paquete celular

El volumen del paquete celular es otro parámetro para observar el incremento de la biomasa, en una suspensión celular, en un ciclo de cultivo. Tomando en consideración la figura 2.11 se determinó que la acumulación del peso fresco y seco es muy similar al volumen de paquete celular. En esta misma grafica se observa el máximo de biomasa se alcanzó en el día 22 teniendo una relación muy similar a las curvas de pesos fresco y seco.

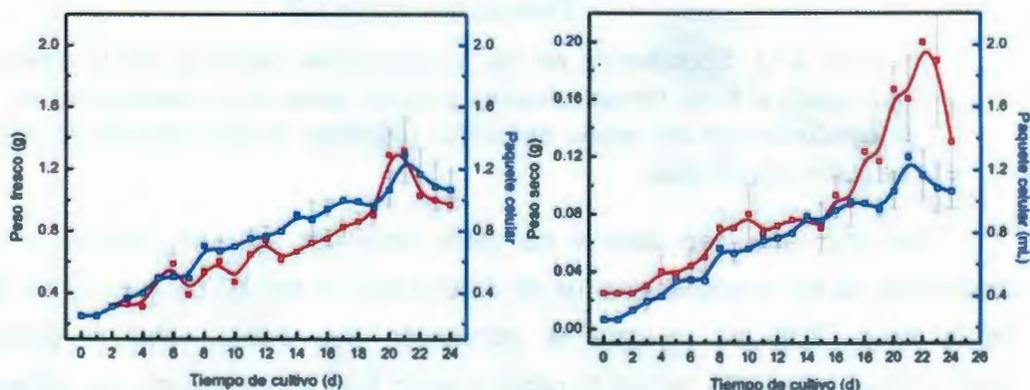


Figura 2.11. Crecimiento de las suspensiones celulares de *D. carota* estimando el peso fresco (cuadros rojos, panel izquierdo), peso seco

(cuadros rojos, panel derecho) y el volumen del paquete celular (cuadros azules, ambos páneles) durante el ciclo de cultivo de 24 días.

2.2.3.1.5. Número de células

En la figura 2.12 se muestra la curva de crecimiento de las suspensiones celulares de la especie *D. carota*; el mayor número de células alcanzado fue de 2.98×10^6 células mL^{-1} a los 20 días de cultivo. Con referencia a los datos obtenidos se decidió resembrar cada 14 días.

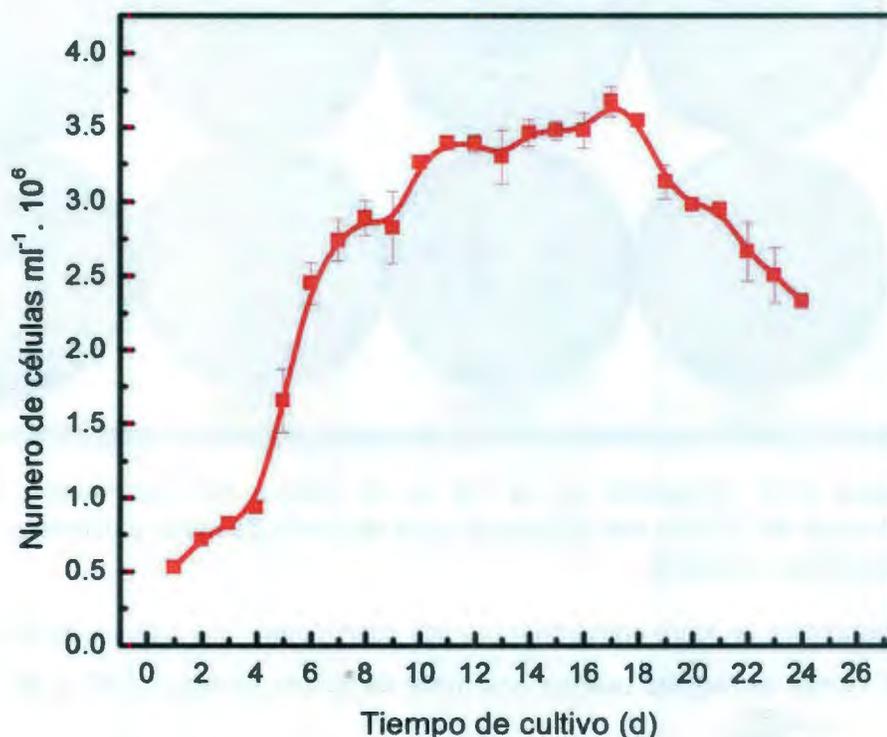


Figura 2.12. Crecimiento de las suspensiones celulares de *D. carota* estimando el número de células durante el ciclo de cultivo de 24 días.

2.3.4. Inducción de la ES

Tras haber hecho la debida caracterización, se determinó subcultivar cada 14 días para obtener la densidad necesaria de suspensiones celulares para inducir la ES. Posteriormente, se realizó un bioensayo con diferentes densidades celulares y dos tipos de mallas una de 50 y otra de 60 μm de nylon con suspensiones celulares de 7 días de edad y así obtener las condiciones óptimas para reproducir la ES y probar el efecto de los

CAPÍTULO II

inhibidores. Como puede apreciarse en la figura 2.13, existe una similitud entre la cantidad de embriones obtenidos con referencia al tamaño de la malla, sin embargo, a mayor densidad celular disminuye el número de embriones.

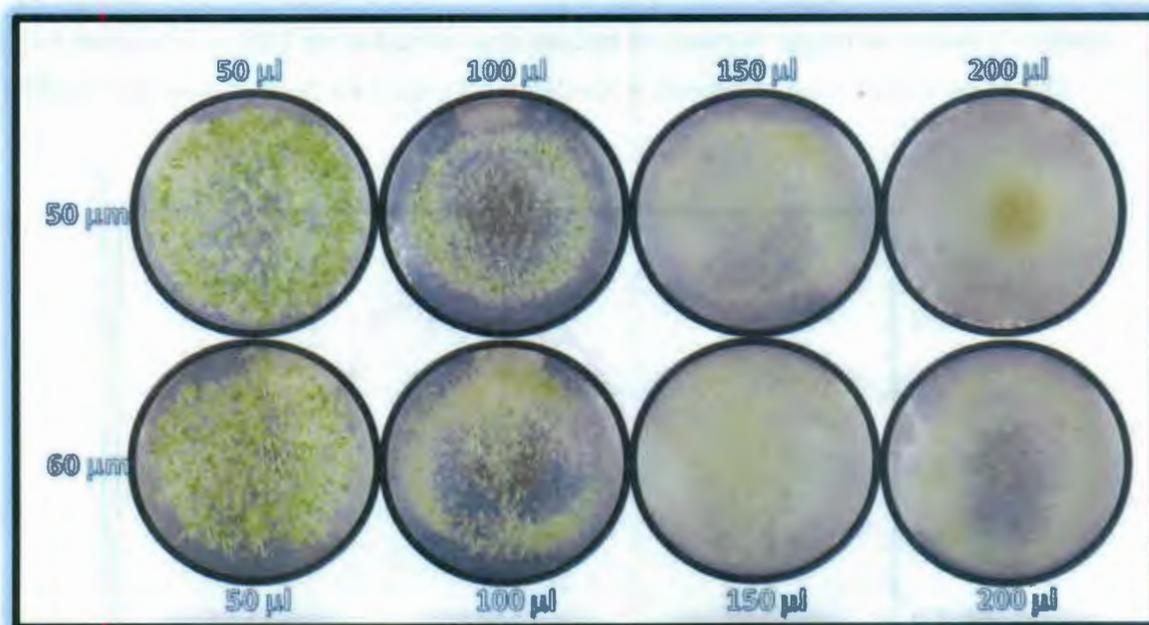


Figura 2.13. Obtención de la ES en *D. carota* con suspensiones celulares de 21 días con diferentes tipos de malla de nylon y diferentes densidades celulares

En este experimento se logró comprobar que las condiciones ideales para la inducción de la ES de *D. carota* se registra usando una malla de 50 μ m de nylon y 50 μ l de densidad celular.

Una vez ya establecidas las condiciones favorables para la inducción de la ES se usaron suspensiones celulares de 5, 7 y 9 días de edad para determinar en cuál de estos días se obtiene un mayor número de embriones somáticos. Se pudo distinguir en el día 5 hay una mejor respuesta embriogénica, comparándolos con los días 7 y 9, como puede apreciarse en esta figura 2.14. En la literatura científica existen reportes de la obtención de embriones somáticos de suspensiones de 6 a 8 días (Fujimura y Komamine, 1979; Hari, 1980; Warren y Fowler, 1978), por lo que se concluyó usar los tres días de inducción de la ES para probar los inhibidores y ver las diferencias entre éstas.



Figura 2.14. Obtención de embriones somáticos a los 14 días usando diferentes días de inducción en suspensiones celulares de *D. carota*.

2.3.5. Evaluación del efecto inhibitorio mediante dosis-respuesta

Para evaluar la respuesta inhibitoria en la ES en *D. carota* se probaron tres compuestos (cafeína, *p*-hidroxibenzoico y ácido cinámico) a diferentes concentraciones (1, 10, 100 y 1,000 μM). Estos compuestos se han determinado en la fracción de baja masa molecular del medio condicionado de *C. arabica*. Estos compuestos se agregaron a las suspensiones celulares después de 7 días de subcultivo y se evaluaron siete días después cuando las células cumplieran 14 días. Se determinó el número de embriones totales obtenidos, así como cada uno de los cuatro estadios principales de *D. carota*.

En la figura 2.15 se muestra el efecto inhibitorio de una concentración 1 μM de los tres inhibidores en la ES de *D. carota*. Las suspensiones de cinco días son las que más inhibición de la ES presentan con el ácido *p*-hidroxibenzoico y la cafeína, en tanto que el ácido cinámico es el compuesto que abate casi por completo la ES. Por otro lado, se sabe que el día 7 es el día utilizado para obtener embriones somáticos y en este experimento es donde la inhibición fue más intensa haciendo que el número de embriones reduzca en un 90%. En el día 9 el abatimiento también se observa en un grado menor que el día 7, sin embargo existe una reducción en el número de embriones obtenidos con referencia al día 5.

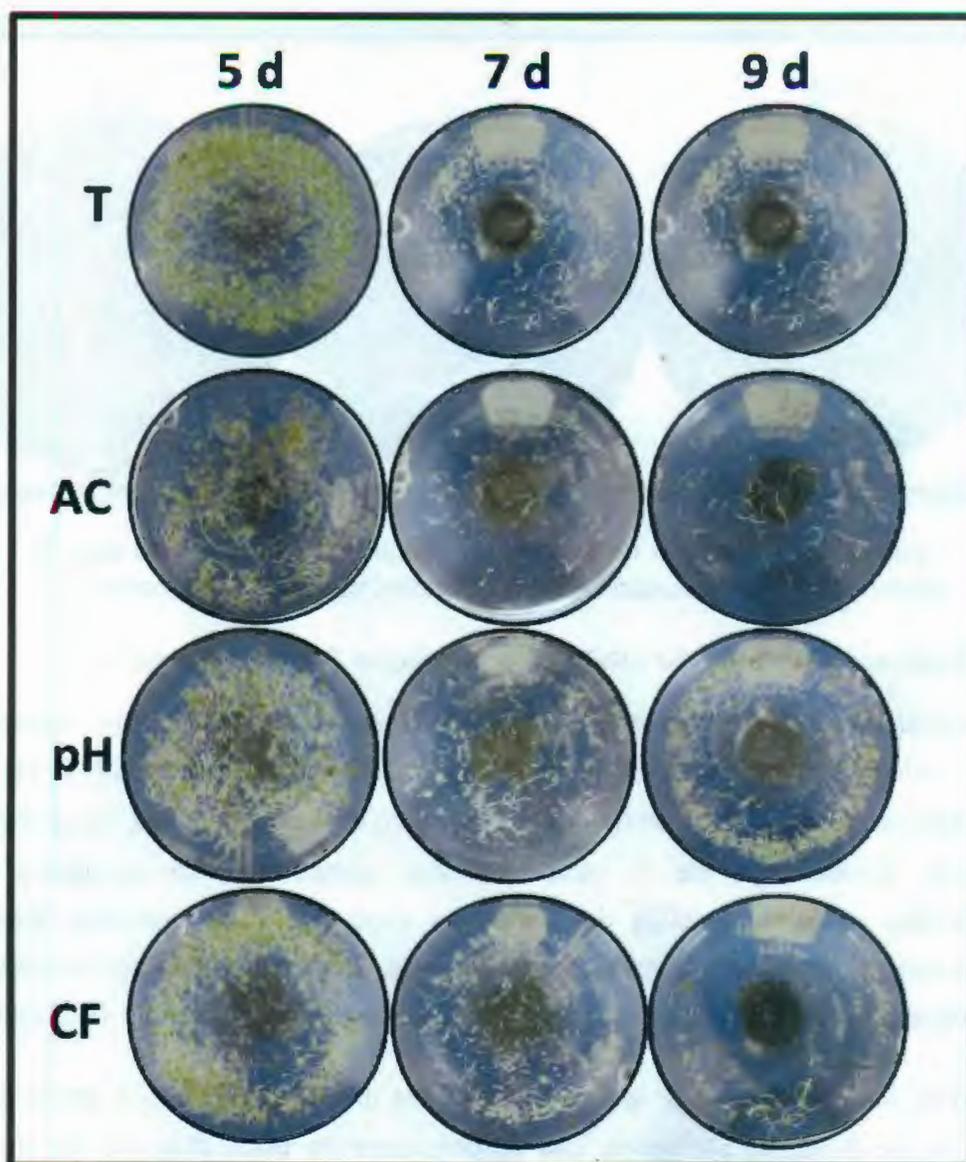


Figura 2.15. Determinación del efecto inhibitorio de la ES de *D. carota* con 1 μ M de ácido cinámico (AC), ácido *p*-hidroxibenzoico (pH) y cafeína (CF) a diferentes días de inducción 5, 7 y 9 días.

En la figura 2.16 se muestra el efecto inhibitorio de una concentración de 10 μ M de los tres inhibidores en la ES de *D. carota*. Las suspensiones de cinco días son las que más inhibición de la ES presentan con el ácido *p*-hidroxibenzoico y la cafeína, en tanto que el ácido cinámico es el compuesto que abate casi por completo la ES.

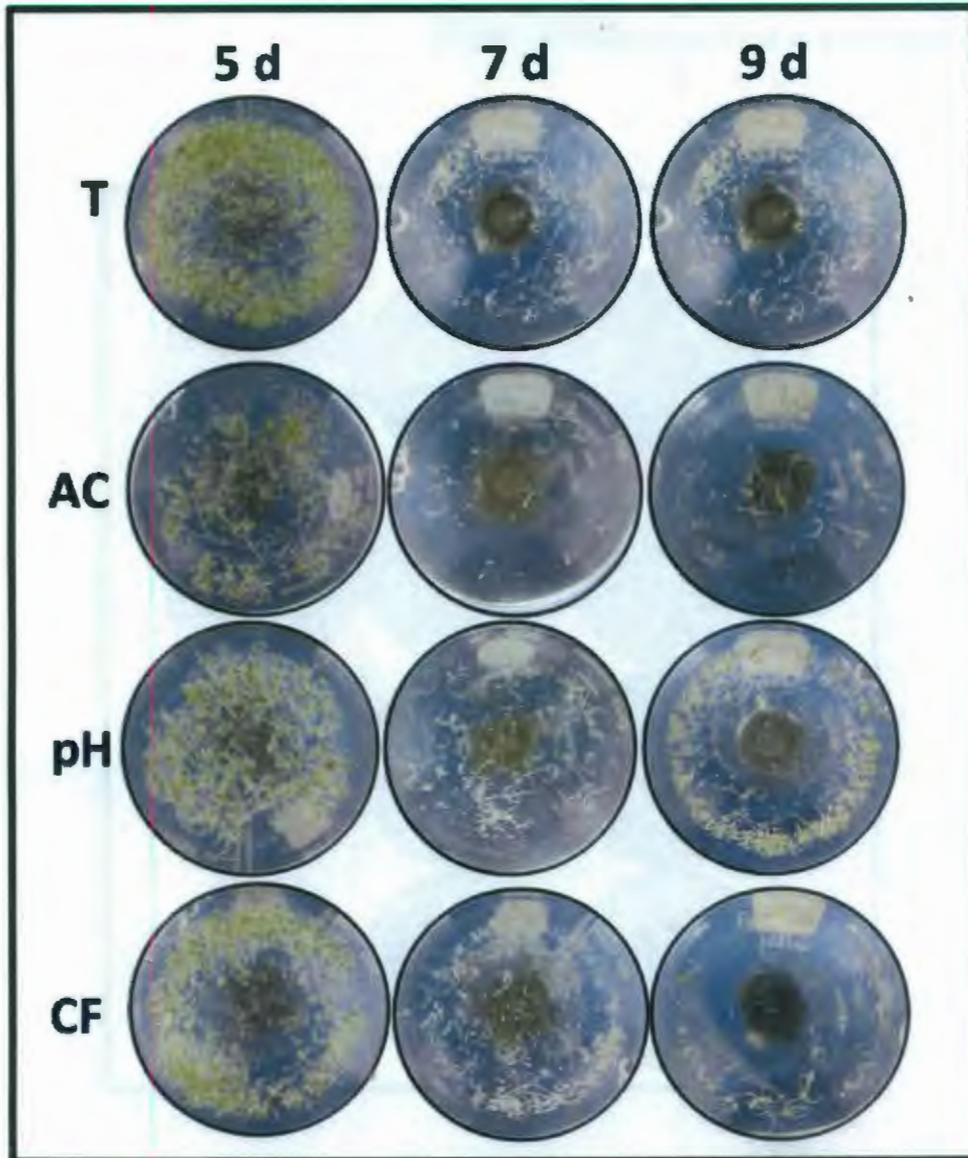


Figura 2.16. Determinación del efecto inhibitorio de la ES de *D. carota* con 10 μM de ácido cinámico (AC), ácido *p*-hidroxibenzoico (pH) y cafeína (CF) a diferentes días de inducción 5, 7 y 9 días.

En la figura 2.17 se puede observar más claramente la inhibición que causa el ácido cinámico en la ES de *D. carota* debido a que cuando al medio de cultivo se le añade una concentración de 100 μM el abatimiento es del 99% ya que los embriones no pasan del estadio globular y por ende la ES no puede seguir.

En esta misma figura se observa que la cafeína causa una inhibición en menor grado que

CAPÍTULO II

el ácido cinámico y el ácido *p*-hidroxibenzoico.

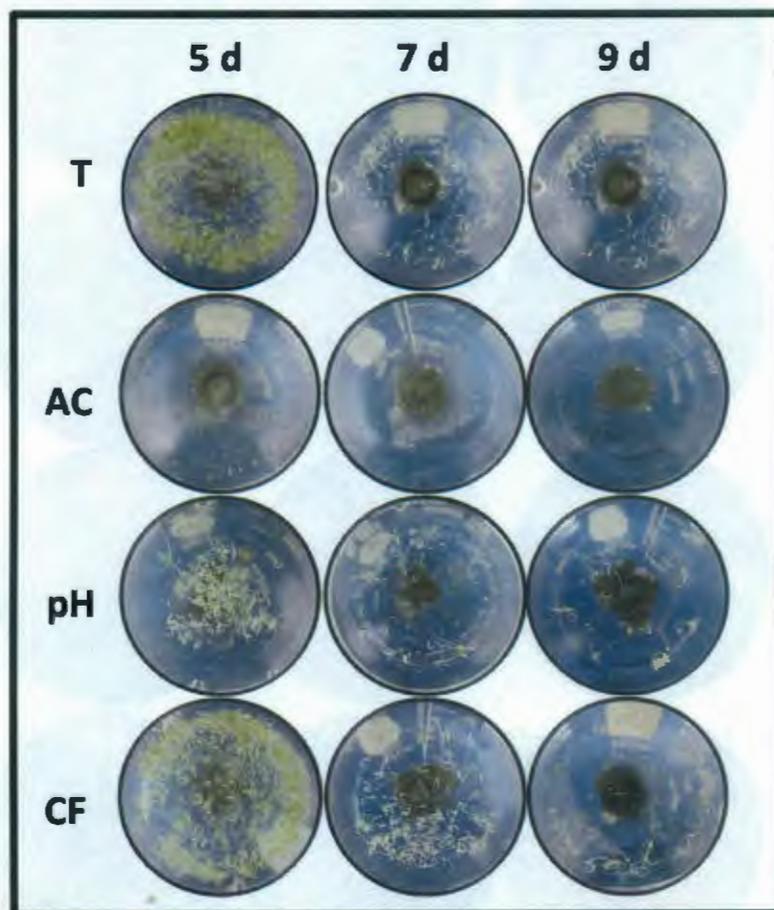


Figura 2.17. Determinación del efecto inhibitorio de la ES de *D. carota* con 100 μM de ácido cinámico (AC), ácido *p*-hidroxibenzoico (pH) y cafeína (CF) a diferentes días de inducción 5, 7 y 9 días.

Por último, en los experimentos de inhibición se probó la concentración de 1,000 μM y claramente se puede distinguir que a esta concentración las masas embriogénicas son completamente inhibidas en presencia de los ácido cinámico y *p*-hidroxibenzoico ya que no desarrollan embriones con referencia la testigo (Fig. 2.18). En presencia de cafeína en los días 5 y 7 existe una producción de embriones menor en comparación con el testigo de cada día.

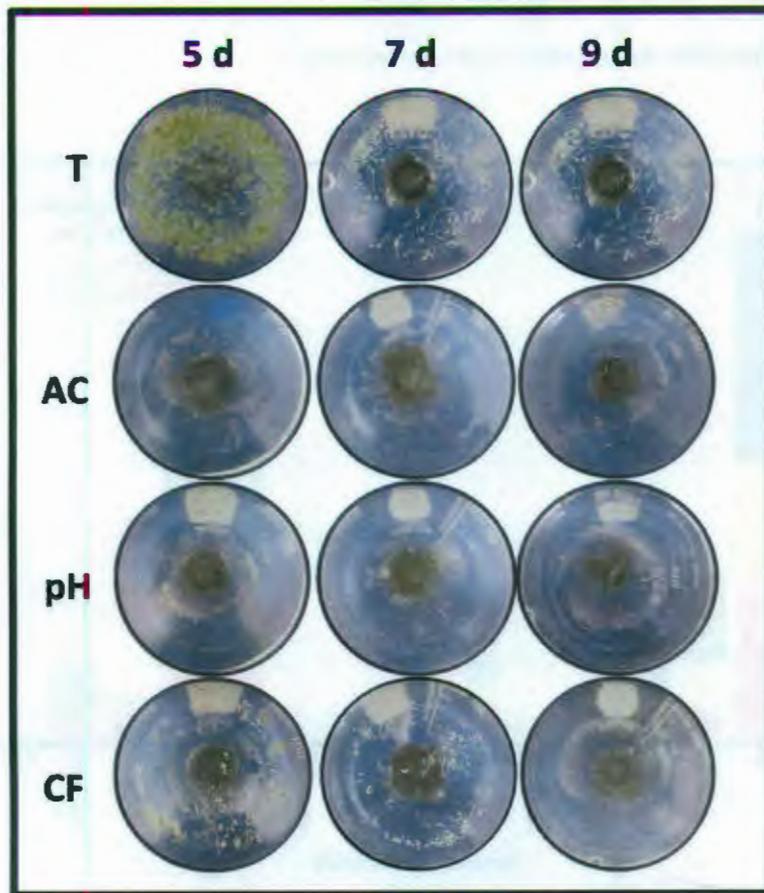


Figura 2.18. Determinación del efecto inhibitorio de la ES de *D. carota* con 1,000 μM de ácido cinámico (AC), ácido *p*-hidroxibenzoico (pH) y cafeína (CF) a diferentes días de inducción, 5, 7 y 9 días.

Para poder entender mejor este proceso de inhibición, se llevó a cabo el conteo de embriones somáticos por estadio de desarrollo y se pudo determinar el día donde hubo mayor inhibición y a que concentración. En la figura 2.19 se vislumbran los resultados recabados a los 14 días posteriores a la inducción y mostraron el efecto inhibitorio, que causó una disminución en el número de embriones somáticos obtenidos en comparación con el testigo. Específicamente, los compuestos que causaron mayor daño fueron el ácido cinámico (100 y 1,000 μM) y el ácido *p*-hidroxibenzoico (1,000 μM), abatiendo por completo la ES. Sin embargo, a pesar de que la ES disminuye se puede observar la presencia de embriones cotiledonares, sugiriendo que a mayor concentración de cada

CAPÍTULO II

inhibidor se produce un daño mayor en las masas pre-embriogénicas y por lo tanto se produce una disminución en la producción embriones.

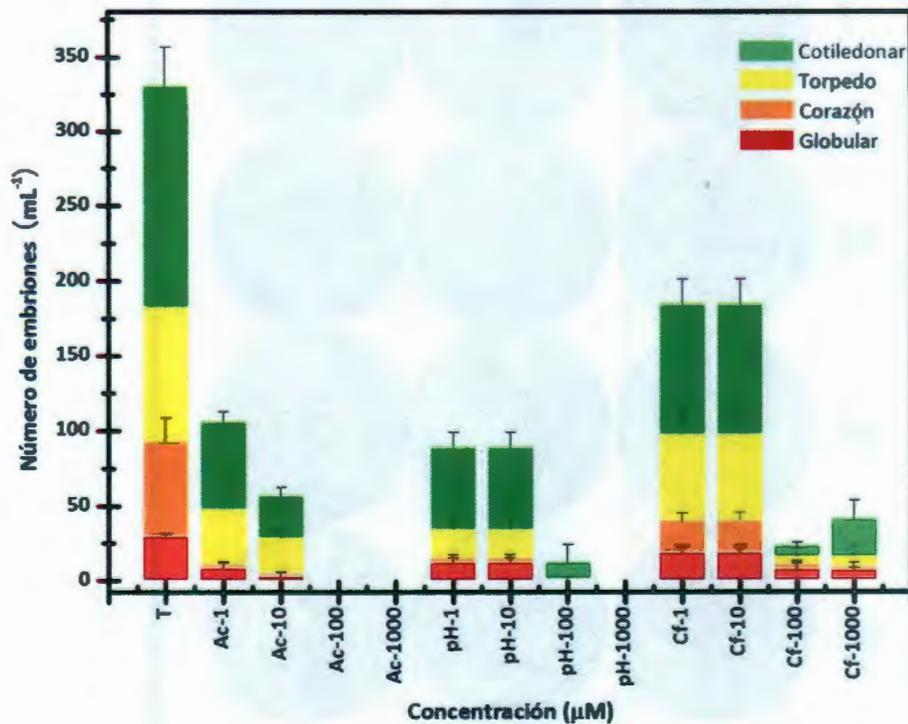


Figura 2.19. Efecto de la inhibición de la ES producido por ácido cinámico (Ac), ácido *p*-hidroxibenzoico (pH) y cafeína (Cf). Las barras representan el error estándar (n=3).

Cuando se adicionaron estos compuestos a los cultivos de 7 días se pudo corroborar que también existe una inhibición, pero aún más acentuada, ya que la tendencia de la inhibición de cada compuesto es similar a la del día 5, sin embargo, difiere en el número de embriones obtenidos en este día. De nueva cuenta se estableció que las concentraciones que causan daños irreparables a las masas proembriogénicas son el ácido cinámico a 100 y 1,000 μM , y en menor grado el ácido *p*-hidroxibenzoico a 1,000 μM , ya que sólo se logró contabilizar embriones cotiledonares; este resultado puede deberse que las reprogramación celular de las células estaba ya lista por lo que la adición de este compuesto no hizo afectó a estas células y pudieron seguir con el desarrollo para producir embriones, pero no ocurrió así con el resto de células inoculadas en el medio de

cultivo (Fig. 2.20).

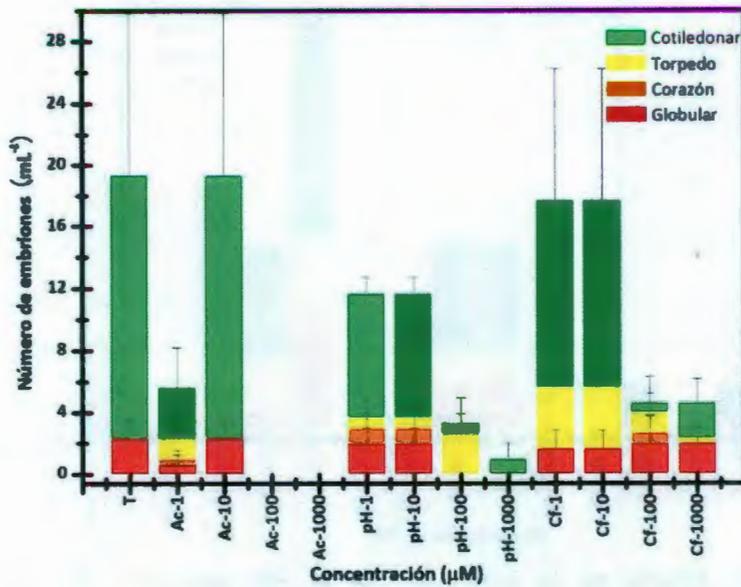


Figura 2.20. Efecto de la inhibición de la ES producido por ácido cinámico (Ac), ácido *p*-hidroxibenzoico (pH) y cafeína (Cf). Las barras representan el error estándar (n=3).

En el día 9 estos compuestos inhiben el proceso embriogénico y el número de embriones obtenidos disminuyó igual como sucedió en el día 7. Nuevamente se observa que las concentraciones de 100 y 1000 μM para los ácido cinámico y *p*-hidroxibenzoico y la cafeína no permitieron el desarrollo de embriones produciendo una inhibición de 100% para estas concentraciones. No obstante, hubo un resultado muy peculiar y fue el que se produjo con cafeína 1 μM , ya que el número de embriones obtenidos fue mayor que el testigo, llevando a sugerir que a esta concentración hay una respuesta inductora para las suspensiones celulares de 9 días.

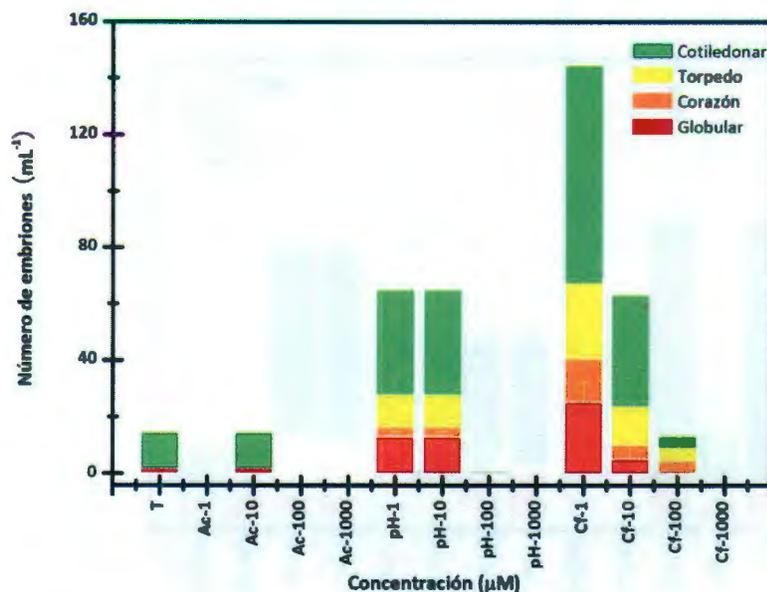


Figura 2.21. Efecto de la inhibición de la ES producido por ácido cinámico (Ac), ácido *p*-hidroxibenzoico (pH) y cafeína (Cf). Las barras representan el error estándar (n=3).

2.4. DISCUSIÓN

Desde finales de los años cincuenta se obtuvo ES en *D. carota* (Reinert, 1959; Steward et al., 1958) y se ha considerado desde entonces, como un cultivo altamente eficiente en la obtención de embriones somáticos. Esto ha generado que innumerables grupos de trabajo utilicen esta especie como modelo de estudio para tratar de entender lo que ocurre desde los puntos de vista fisiológico, bioquímico y molecular. En la literatura reciente existen reportes sobre la utilización de la ES para estudiar los aspectos bioquímicos (Costa et al., 2009; Frederico et al., 2009) moleculares (Guan et al., 2009), y fisiológicos (Balestrazzi et al., 2001; Dobrowolska et al., 2012), entre otros. La mayor parte de la información que tenemos hoy en día, sobre el proceso embriogénico, ha sido obtenida en cultivos celulares de *D. carota*. Por ello, para este trabajo se usaron suspensiones celulares de zanahoria.

Durante el estudio que se ha realizado de la ES, se ha demostrado que las células secretan proteínas específicas (Coutos-Thévenot et al., 1992; Filipecki y Przybecki, 1994; Nielsen y Hansen, 1992) arabinogalactoproteínas (Stacey et al., 1990), proteínas

relacionadas con la patogenicidad (De Jong et al., 1992), oligosacáridos (Dyachok et al., 2002) y compuestos de baja masa molecular (Kobayashi et al., 2000; Umehara et al., 2005; 2007) que pueden actuar como inductores e inhibidores de la ES. El conjunto de las sustancias secretadas por las células, más el medio de cultivo donde se cultivan se conoce como medio condicionado.

Existen reportes en los que se describen moléculas secretadas al medio de cultivo que actúan como inhibidores del proceso embriogénico. Hasta el momento solo se han identificado dos compuestos de baja masa molecular: el alcohol 4-hidroxibencilo responsable de la inhibición de la ES a densidades celulares elevadas (Kobayashi et al., 2000) y el vanilil bencil éter que inhibe el desarrollo del suspensor en *Larix leptolepis* (Umehara et al., 2005). Más recientemente el equipo de trabajo del doctor Loyola-Vargas pudo determinar que se puede inhibir el proceso embriogénico de *D. carota* y *C. canephora* al adicionarle la fracción de baja masa molecular procedente del medio de cultivo condicionado de *C. arabica*. De la fracción de baja masa molecular procedente del medio condicionado de *C. arabica* y por medio de la técnica de HPLC, se pudieron observar cinco picos, hasta la fecha se han identificado tres de ellos, la cafeína y los ácido *p*-hidroxibenzoico y trans-cinámico. Los compuestos fenólicos están involucrados en el sistema de protección de las plantas contra la invasión de patógenos como bacterias, hongos y virus y pestes como insectos (Friedman y Jürgens, 2000).

Nic-Can et al. (en preparación) determinó el efecto inhibitorio que tienen los ácidos cinámico, *p*-hidroxibenzoico y la cafeína sobre la ES en explantes foliares de *C. canephora*. Sus resultados sugieren que estos compuestos, adicionados al medio de cultivo, inhiben de forma importante la ES en *C. canephora*. La concentración que causó más daño fue la de 1,000 μM .

Los resultados anteriores son consistentes con los obtenidos en la presente investigación, en la que se observó que la presencia de los ácidos cinámico y el *p*-hidroxibenzoico, así como de cafeína inhibe la ES en las suspensiones celulares de *D. carota*, en algunos de los casos en concentraciones muy por debajo de 1,000 μM .

Actualmente sabemos que para que se lleve a cabo el proceso embriogénico se requiere que las auxinas provoquen la polaridad de la célula inicial (Petrasek y Friml, 2009), esto lo

CAPÍTULO II

hace un flujo altamente dirigido de la concentración interna de las auxinas. Las auxinas añadidas exógenamente pueden cancelar la polaridad de la masa embriogénica al difundirse dentro de la misma, lo que induce la inhibición del proceso embriogénico iniciado por las auxinas endógenas. Por tanto, al eliminar el 2,4-D existe toda una reprogramación celular que conlleva a la producción de embriones somáticos, sin embargo, cuando se adicionan estos compuestos de tipo fenólico, que tienen una estructura similar a las auxinas, éstos pueden competir por el sitio activo y conllevar a una inhibición como se pudo observar en este trabajo.

3. BIBLIOGRAFÍA

- Balestrazzi A., G. Bernacchia, L. Pitto, G. Luccarini and D. Carbonera, Spatial expression of DNA topoisomerase I genes during cell proliferation in *Daucus carota*, *European Journal of Histochemistry*, 45: 31-38, (2001).
- Costa J. H., D. F. De Melo, Z. Gouveia, H. Guerrera Cardoso, A. Peixe and B. Arnholdt-Schmitt, The alternative oxidase family of *Vitis vinifera* reveals an attractive model to study the importance of genomic design, *Physiol. Plant.*, 137: 553-565, (2009).
- Coutos-Thévenot P., I. Goebel-Tourand, M. L. Mauro, J.-P. Jouanneau, M. Boulay, A. Deloire and J. Guern, Somatic embryogenesis from grapevine cells. I. Improvement of embryo development by changes in culture conditions, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 29: 125-133, (1992).
- De Jong A. J., J. Cordewener, F. Lo Schiavo, M. Terzi, J. Vandekerckhove, A. Van Kammen and S. C. De Vries, A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase, *Plant Cell*, 4: 425-433, (1992).
- De Vries S. C., H. Booij, P. Meyerink, G. Huisman, H. D. Wilde, T. L. Thomas and A. Van Kammen, Acquisition of embryogenic potential in carrot cell-suspension cultures, *Planta*, 176: 196-204, (1988).
- Dobrowolska I., O. Majchrzak, T. Baldwin and E. Kurczynska, Differences in protodermal cell wall structure in zygotic and somatic embryos of *Daucus carota* (L.) cultured on solid and in liquid media, *Protoplasma*, 249: 117-129, (2012).

- Dyachok J. V., M. Wiweger, L. Kenne and S. Von Arnold, Endogenous nod-factor-like signal molecules promote early somatic embryo development in norway spruce, *Plant Physiol.*, 128: 523-533, (2002).
- Filipecki M. K. and Z. Przybecki, Marker proteins of somatic embryogenesis in cucumber (*Cucumis sativus* L.), *Plant Gen.*, 35: 1-9, (1994).
- Frederico A. M., M. D. Campos, H. Guerra Cardoso, J. Imani and B. Arnholdt-Schmitt, Alternative oxidase involvement in *Daucus carota* somatic embryogenesis, *Physiol. Plant.*, 137: 498-508, (2009).
- Friedman M. and H. S. Jürgens, Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds, *J. Agric. Food Chem.*, 48: 2101-2110, (2000).
- Fujimura T. and A. Komamine, Synchronization of somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture, *Plant Physiol.*, 64: 162-164, (1979).
- Gamborg O. L. and D. E. Eveleigh, Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley, *Can. J. Biochem.*, 46: 414-421, (1968).
- Guan Y., H. Ren, H. Xie, Z. Ma and F. Chen, Identification and characterization of bZIP-type transcription factors involved in carrot (*Daucus carota* L.) somatic embryogenesis, *Plant J.*, 60: 207-217, (2009).
- Hahlbrock K., J. Ebel and A. Oaks, Determination of specific growth stages of plant cell suspension cultures by monitoring conductivity changes in the medium, *Planta*, 118: 75-84, (1974).
- Hahlbrock K. and E. Kuhlen, Relationship between growth of parsley and soybean cells in suspension cultures and changes in the conductivity of the culture medium, *Planta*, 108: 271-278, (1972).
- Hall R. D., The initiation and maintenance of callus cultures of carrot and tobacco, in: *Plant tissue culture manual. Supplement 3*, (Lindsey K., ed.), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 1-19, (1991).

CAPÍTULO II

- Hari V., Effect of cell density changes and conditioned media on carrot cell embryogenesis, *Z. Pflanzenphysiol.*, 96: 227-231, (1980).
- Kobayashi T., K. Higashi and H. Kamada, Inhibitory effects of p-hydroxybenzyl alcohol on somatic embryogenesis in carrot cell cultures, *Plant Biotechnology*, 17: 87-92, (2000).
- Kwok K. H., P. Tsoulpha and P. M. Doran, Limitations associated with conductivity measurement for monitoring growth in plant tissue culture, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 29: 93-99, (1992).
- Martin S. M., D. Rose and V. Hui, Growth of plant cell suspension cultures with ammonium as the sole source of nitrogen, *Can. J. Bot.*, 55: 2838-2843, (1977).
- Moreno-Valenzuela O., J. Coello-Coello, V. M. Loyola-Vargas and F. Vázquez-Flota, Nutrient consumption and alkaloid accumulation in a hairy root line of *Catharanthus roseus*, *Biotechnol. Lett.*, 21: 1017-1021, (1999).
- Murashige T. and F. Skoog, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.*, 15: 473-497, (1962).
- Nielsen K. A. and I. B. Hansen, Appearance of extracellular proteins associated with somatic embryogenesis in suspension cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.), *J. Plant Physiol.*, 139: 489-497, (1992).
- Petrasek J. and J. Friml, Auxin transport routes in plant development, *Development*, 136: 2675-2688, (2009).
- Reinert J., Über die kontrolle der morphogenese und die induktion von adventivembryonen an gewebe-kulturen aus karotten, *Planta*, 53: 318-333, (1959).
- Stacey N. J., K. Roberts and J. P. Knox, Patterns of expression of the JIM4 arabinogalactan-protein epitope in cell cultures and during somatic embryogenesis in *Daucus carota* L., *Planta*, 180: 285-292, (1990).
- Steward F. C., M. O. Mapes and K. Mears, Growth and organized development of cultured

cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells, *Am. J. Bot.*, 45: 705-708, (1958).

Taya M., M. Hegglin, J. E. Prenosil and J. R. Bourne, On-line monitoring of cell growth in plant tissue cultures by conductometry, *Enzyme Microb. Technol.*, 11: 170-176, (1989).

Umehara M., S. Ogita, H. Sasamoto, H. Koshino, T. Asami, S. Fujioka, S. Yoshida and H. Kamada, Identification of a novel factor, vanillyl benzyl ether, which inhibits somatic embryogenesis of Japanese larch (*Larix leptolepis* Gordon), *Plant Cell Physiol.*, 46: 445-453, (2005).

Umehara M., S. Ogita, H. Sasamoto, H. Koshino, T. Nakamura, T. Asami, S. Yoshida and H. Kamada, Identification of a factor that complementarily inhibits somatics embryogenesis with vanillyl benzyl ether, *In Vitro Cell. Dev. Biol. -Plant*, 43: 203-208, (2007).

Veliky I. A. and D. Rose, Nitrate and ammonium as nitrogen nutrients for plant cell cultures, *Can. J. Bot.*, 51: 1837-1844, (1973).

Warren G. S. and M. W. Fowler, Cell number and cell doubling times during the development of carrot embryoids in suspension culture, *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 34: 356-357, (1978).

CAPÍTULO III

Estudio de la inhibición de la ES en *D. carota* por compuestos fenólicos

3. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

3.1. CONCLUSIONES

Se logró determinar que los compuestos identificados en la fracción de baja masa molecular provenientes del medio condicionado de *C. canephora* al usarlos por separado y de origen sintético causan una inhibición muy notoria en la ES de *D. carota*.

3.2. PERSPECTIVAS

Entre las perspectivas de este trabajo se encuentra el estudio a nivel histológico para poder determinar en qué etapa se detiene la ES de *D. carota* y que cambio causa a nivel celular la presencia de estos compuestos a las masas preembriónicas y los embriones somáticos.

Otro avance sería el purificar los compuestos que se encuentran presentes en la fracción de baja masa molecular y probarlos de manera conjunta y por separado para ver la respuesta inhibitoria en la ES de cultivos altamente embriogénicos.