

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA  
INGENIERIA EN BIOTECNOLOGÍA

Hibridación interespecífica de *rosa* SP y *petunia nictaginiflora* mediante fusión de protoplastos de células obtenidas de hojas para determinar su grado de compatibilidad.

PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR: Adriana Gioconda De La Torre Rodríguez

Sangolquí, 19 de Enero, 2007

**HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS**

**ELABORADO POR**

**ADRIANA GIOCONDA DE LA TORRE RODRIGUEZ**

**DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA  
INGENIERIA EN BIOTECNOLOGÍA**

.....  
**SEÑOR CRNL RONALD RUNRUIL**

.....  
**SECRETARIO ACADÉMICO**

**Sangolquí, 19 de Enero, 2007**

## RESUMEN

Se evaluó la recuperación de protoplastos aislados a partir de hojas de rosa y petunia en base a tres tratamientos enzimáticos T<sub>1</sub> (Celulasa 0.8%, Macerozima y pectoliasa 0.05%), T<sub>2</sub> (Celulasa 1%, Macerozima y pectoliasa 0.5%) y finalmente T<sub>3</sub> (Celulasa 2.5%, Macerozima y pectoliasa 0.5%).

La mayor recuperación de protoplastos aislados en ambas especies fue obtenida al aplicar el T<sub>3</sub> (Celulasa 2.5%, Macerozima y pectoliasa 0.5%), obteniéndose  $2.36 \times 10^5$  protoplastos x ml<sup>-1</sup> para petunia en un tiempo de 11 – 12 horas y  $2.41 \times 10^5$  protoplastos x ml<sup>-1</sup> para rosa en un tiempo de 12 – 13 horas.

La fusión entre protoplastos de rosa y petunia fue evaluada mediante pruebas morfométricas y de coloración; encontrándose un porcentaje de 74.78% de heterocariontes, mientras que el restante 25.22% corresponde a homocariontes.

Los medios de cultivo MS + V220 y MS más complejo vitamínico, fueron empleados para el crecimiento y desarrollo de las células fusionadas, ambos medios resultaron adecuados para la diferenciación de protoplastos en callos en un tiempo de 30 días.

## SUMMARY

We evaluated the obtainment of isolation protoplast in leaves of rose and petunia by means of three different enzymatic treatments, T<sub>1</sub> (Cellulase 0.8%, Macerozime and pectoliase 0.05%), T<sub>2</sub> (Cellulase 1%, Macerozime and pectoliase 0.5%) and finally T<sub>3</sub> (Cellulase 2.5%, Macerozime and pectoliase 0.5%).

The biggest recovery of isolation from protoplast, was obtained by means of T<sub>3</sub> (Cellulase 2.5%, Macerozime and pectoliase 0.5%), in the development of the protocol were obtained  $2.36 \times 10^5$  protoplasts  $\times \text{ml}^{-1}$  from petunia in 11 to 12 hours and  $2.41 \times 10^5$  protoplasts  $\times \text{ml}^{-1}$  from rose in 12 to 13 hours.

The fusion of protoplast between rose and petunia was evaluated by means of morphometric test and coloration test; we finding 74.78% of heterocarionte, so 25.22% of homocarionte

The culture of protoplast evaluated in the means of MS + V220 and MS plus vitamin complex, both cultures gave a standar to get a mean to be capable the growth and development of the melting cells in callus around 30 days

## **DEDICATORIA**

Dedico esta tesis a todas las personas que creen en la justicia y honestidad ante cualquier circunstancia

## AGRADECIMIENTOS

De forma infinita agradezco a Dios por haberme dado a mis padres y mis hermanos, quienes me han brindado su amor y apoyo, sobre todo en los momentos más difíciles, quienes siempre de manera incondicional esten junto a mi.

Al Doctor Darwin Rueda O., Director del Tema de Tesis desarrollado, quien con todos sus conocimientos ha sabido guiar el trabajo teórico – práctico de la mejor manera, para que sea un trabajo completo bajo diferentes aspectos y para que el mismo culmine de manera exitosa.

A la Ing. Tatiana Paez, docente del Departamento de Ciencias de la Vida – Biotecnología, por el apoyo brindado durante el desarrollo de la Tesis.

Agradezco al Ing. Pablo Landázuri y a la señorita Ma. Fernanda Amores, quienes han sido un respaldo tanto emocional como académico para que el proyecto culmine de manera exitosa.

Agradezco al Ingeniero Jaime Villacís, Biometrista del Instituto Agropecuario Superior Andino – IASA I, quien a guiado el presente trabajo en base a la aplicación Estadística y de Diseño Experimental a que se obtengan resultados confiables y reales para su aplicación en el campo práctico.

Al General Fabián Varela, hombre al que admiro y respeto, por ser una imagen para las personas que están cerca de él, y sobre todo ser un ejemplo a seguir.

De manera muy especial al Dr. Nikolái Espinosa, excelente amigo y profesional, incondicional que ante cualquier circunstancia siempre está presto a ayudar y colaborar a quien lo necesita.

Al Dr. Víctor Jiménez, Jefe del Departamento de Biotecnología del CIGRAS – UCR, por todo el aporte tanto académico, científico como profesional para que el desarrollo de este trabajo culmine de manera exitosa.

Agradezco por toda la colaboración y sobre todo por todo el entusiasmo que presentaron para este proyecto y ante mi persona al Ing. César Falconí MsC, a la Ing. Elena Mafla, Lic. Marco Taco, Dr. Juan Giacometti e Ing. Juan Tigrero, Personal docente e Investigadores del Instituto Agropecuario Superior Andina IASA I.

A los Doctores Norman Soria y Cristina Briceño, por su apoyo incondicional y profesionalismo brindado como aporte para el presente trabajo.

Al Dr. Eduardo Moreira, Dr. Carlos Caicedo, Dr. Eduardo Morillo e Ing. Luis Fernando Rodríguez, científicos del Centro de Investigaciones del DENAREF – INIAP, y del Centro de Desarrollo de Biotecnología de la UTPL,

por todo el apoyo y ayuda brindada, ampliando conocimientos y técnicas para este trabajo.

Mis más sinceros agradecimientos al Crnl. CSM. Carlos G. Buenaño, Vicerrector de Docencia, por ser un hombre de justicia y verdad, merecedor del respeto y confianza de las personas que están junto a él.

Al Crnl. Lizandro Granda, Director de Posgrados de la ESPE; quien ha sabido mantener su ética, respeto y sobretodo profesionalismo ante los estudiantes, guiándolos a ser hombres de bien.

Al Dr. Jairo Yépez, por ser más que un buen abogado, un buen amigo incondicional que no ha dejado que el derecho a la verdad quede en segundo plano.

A la Abogada Laura López Acurio, excelente profesional y amiga, por todos los buenos y malos momentos compartidos y por saber formar a los estudiantes que están cerca de ella inculcando el valor de la honestidad, el respeto y la justicia.

Agradezco de manera muy especial al Señor Tecnólogo Hernando Torres, por su ayuda desinteresada en todos los aspectos relacionados al espacio físico necesario para el desarrollo de este proyecto.

Finalmente agradezco a todos mis amigos y compañeros, en especial a todos aquellos que egresaron en el período Agosto 2005 de la Facultad de Ciencias Aplicadas, por saber valorar el sentido de la amistad y el compañerismo bajo cualquier circunstancia sin dejar de lado la esencia personal.

## INDICE

### CAPITULO I

1.1	Marco Teórico	1
1.1.1	Hibridación Somática	2
1.1.2	Tipos de híbridos somáticos	6
1.1.2.1	Híbridos simétricos	7
1.1.2.2	Híbridos asimétrico	7
1.1.2.3	Cíbridos	7
1.1.3	Hibridación Interespecífica	12
1.1.4	Intervención del ADN en el proceso de Hibridación	14
1.1.5	Determinación de la compatibilidad celular y sexual entre ambas especies.	16
1.1.5.1	Cruzamientos interespecíficos	16
1.1.6	Determinación del Número Cromosómico de Especies Vegetales	19
1.1.6.1	Conteo Cromosómico en células somáticas	19
1.1.6.1.1	Técnica de Aplastamiento para determinación de número cromosómico.	20

## CAPÍTULO II

2.1 Materiales y Métodos	22
2.1.1 Pruebas de extracción de protoplastos mediante tratamientos enzimáticos	22
2.1.1.1 Material Vegetal	22
2.1.1.1.1 Obtención, Preparación y Desinfección del material vegetal	22
2.1.1.2 Preparación de los tratamientos enzimáticos	23
2.1.2 Aislamiento de protoplastos	23
2.1.2.1 Tratamiento enzimático y medio de incubación	23
2.1.3 Limpieza y purificación de los protoplastos	25
2.1.4 Pruebas estadísticas	26
2.1.5 Fusión de protoplastos	26
2.1.5.1 Fusión química mediante Polietilenglicol (PEG)	26
2.1.6 Medios para cultivos de protoplastos fusionados	27
2.1.7 Determinación del Número Cromosómico de Especies vegetales	28
2.1.7.1 Conteo Cromosómico en células somáticas	28

## CAPÍTULO III

3.1 Resultados y Discusión	30
3.1.1 Resultados	30
3.1.1.1 Aislamiento y purificación de Protoplastos a partir de hojas de <i>Rosa</i> sp.	30
3.1.1.2 Aislamiento de Protoplastos a partir de hojas de <i>Petunia nictaginiflora</i> .	36
3.1.1.3 Fusión y cultivo de protoplastos de <i>Rosa</i> sp. y <i>Petunia nictaginiflora</i> .	42
3.1.1.4 Desarrollo del cariotipo de <i>Petunia nictaginiflora</i> y <i>Rosa</i> sp.	43
3.1.5 Discusión.	46
Conclusiones	50
Recomendaciones	51
Bibliografía	53
Anexos	63

## INDICE DE TABLAS

# TABLA	TEMA	PÁGINA
1	Promedio $\pm$ error estándar del número de protoplastos obtenidos de hojas de Rosa sp bajo el efecto de tres tipos de enzimas, IASA, Ecuador, 2006 (letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas, $p < 0.05$ ).	31
2	Promedio $\pm$ error estándar del número de protoplastos obtenidos a partir de hojas de Rosa sp a diferentes tiempos, IASA, Ecuador, 2006 (letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas, $p < 0.05$ ).	33
3	Promedio $\pm$ error estándar de la interacción de número de protoplastos obtenidos a partir de hojas de Rosa sp a diferentes tiempos bajo el efecto de tres tratamientos enzimáticos aplicados, IASA, Ecuador, 2006.	35
4	Promedio $\pm$ error estándar del número de protoplastos obtenidos de hoas de Petunia nictaginiflora bajo el efecto de	37

	tres tipos de enzimas, IASA, Ecuador, 2006 (letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas, $p < 0.05$ ).	
<b>5</b>	Promedio $\pm$ error estándar del número de protoplastos obtenidos a partir de hojas de <i>Petunia nictaginiflora</i> a diferentes tiempos, IASA, Ecuador, 2006 (letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas, $p < 0.05$ ).	<b>39</b>
<b>6</b>	Promedio $\pm$ error estándar de la interacción de número de protoplastos obtenidos a partir de hojas de <i>Petunia nictaginiflora</i> a diferentes tiempos bajo el efecto de los tres tratamientos enzimáticos aplicados, IASA, Ecuador, 2006.	<b>41</b>

## INDICE DE CUADROS

<b># CUADRO</b>	<b>TEMA</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>1</b>	Concentraciones enzimáticas empleadas para el aislamiento de protoplastos.	<b>23</b>

## INDICE DE FIGURAS

# FIGURA	TEMA	PÁGINA
1	Etapas de la organogénesis somática hasta la regeneración de una nueva planta.	3
2	Destino del material genético nuclear y extranuclear en la fusión de protoplastos.	8
3	Materiales y procesos involucrados en la hibridación somática	11
4	Representación de la Técnica de Fusión de Protoplastos	14
5	Distribución de Técnicas en las que interviene el ADN como herramienta genética.	16
6	Exposición de cortes de mesófilo con solución enzimática a vacío (500 atm)	24
7	Incubación de muestras a oscuridad en agitación constante	25
8	Fase de purificación y lavado de protoplastos mediante centrifugación con CPW 13M	25
9	Reposo de protoplastos de <i>Rosa</i> sp y <i>Petunia nictaginiflora</i> , expuestos a PEG, para ser fusionados.	27
10	Formación de interfase de protoplastos fusionados	28
11	Cromosomas metafásicos de rosa (a) y petuía	29

	(b).	
<b>12</b>	Tiempo óptimo para el aislamiento de protoplastos de Rosa sp de acuerdo a los diferentes tratamientos enzimáticos.	<b>32</b>
<b>13</b>	Tratamientos aplicados en la investigación para determinar el más óptimo por el número de protoplastos aislados	<b>34</b>
<b>14</b>	Aislamiento de protoplastos a diferentes tiempos de exposición enzimática con T1. a) Antes de la primera hora b) Primera hora de exposición c) Séptima hora de exposición d) Doceava hora de exposición.	<b>36</b>
<b>15</b>	Tiempo óptimo de recuperación de protoplastos de Petunia nictaginiflora de acuerdo a los diferentes tratamientos enzimáticos.	<b>38</b>
<b>16</b>	Tratamientos aplicados en la investigación para determinar el más óptimo por el número de protoplastos recuperados	<b>40</b>
<b>17</b>	Fusión de protoplastos, (a) fusión de protoplastos de petunia, (b) fusión de protoplastos de rosa – petunia medidos con micrómetro; (c) protoplastos de rosa – petunia evaluados mediante coloración.	<b>42</b>
<b>18</b>	Diferentes estadios de crecimiento de	<b>43</b>

	protoplastos en los medios de cultivo evaluados para su crecimiento. a) Dos días de crecimiento, b) Primera semana de crecimiento de protoplastos, c) Tercera semana de crecimiento de protoplastos, d) microcallo de protoplastos fusionado.	
<b>19</b>	Cariotipo de la petunia variedad <i>Petunia nictaginiflora</i> , número cromosómico $2n = 18$	<b>44</b>
<b>20</b>	Cariotipo de la rosa variedad <i>Rosa</i> sp., número cromosómico $2n = 22$	<b>45</b>

## INDICE DE ANEXOS

<b># ANEXO</b>	<b>TEMA</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>1</b>	Composición de medio de cultivo Murashige & Skoog 1962 para cultivo de protoplastos de <i>Rosa</i> sp., y <i>Petunia nictaginiflora</i> .(39)	<b>64</b>
<b>2</b>	Composición del medio Murashige & Skoog V220 - gpara cultivo de protoplastos obtenidos de <i>Rosa</i> sp., y <i>Petunia nictaginiflora</i> .	<b>65</b>
<b>3</b>	Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III) para datos	<b>66</b>

	recolectados para <i>Pétunia nictaginiflora</i> .	
<b>4</b>	Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III) para datos recolectados para <i>Rosa</i> sp.	<b>67</b>
<b>5</b>	Técnicas de contaje celular para determinar el conteo de protoplastos.	<b>68</b>
<b>6</b>	Contenido nutricional e ingredientes de v220 – g.	<b>72</b>

## NOMENCLATURA UTILIZADA

<b>ADE</b>	Agua destilada esteril
<b>AIA</b>	Ácido Indol Acético
<b>ANA</b>	Ácido naftalenacético
<b>BAP</b>	6-bencilaminopurina o 6-benciladenina
<b>CCR</b>	Coeficiente de células regeneradas
<b>CPW</b>	Solución de enjuague para protoplastos ( Cell Protoplast Wash )
<b>DMSO</b>	Dimetil Sulfóxido
<b>EC</b>	Eficiencia del cultivo
<b>FAD</b>	Frecuencia absoluta de división
<b>FRD</b>	Frecuencia relativa de división
<b>g</b>	Gravedad
<b>MS</b>	Murashige & Skoog
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>TS</b>	Tasa de supervivencia
<b>V220</b>	Energizante 220

## CAPITULO I

### 1.1 Marco Teórico

La tecnología de transformación de plantas se ha convertido en una plataforma excelente para conseguir la mejora de cultivos así como para llevar a cabo el estudio de la función de los genes en las plantas<sup>2</sup>. Entre las herramientas que han contribuido a estos desarrollos se encuentran el cultivo de tejidos, la transformación de plantas, la hibridación somática, la producción de plantas transgénicas y los marcadores moleculares.<sup>1</sup> Este éxito representa la culminación de muchos años de esfuerzos en mejorar las técnicas de cultivo de tejidos, las técnicas de transformación y la ingeniería genética.

La obtención de plantas transgénicas y modificadas es posible gracias a una característica propia de los vegetales: la **totipotencia**<sup>3</sup>, según la cual cualquier célula de un vegetal tiene el potencial de regenerar una planta completa.

Las células vegetales se pueden cultivar en un medio artificial y en condiciones estériles (para evitar infecciones de patógenos) que aporte los nutrientes necesarios para las divisiones celulares y la proliferación vegetativa<sup>1</sup>.

<sup>4</sup>Existen tres aproximaciones para regenerar plantas completas *in vitro*:

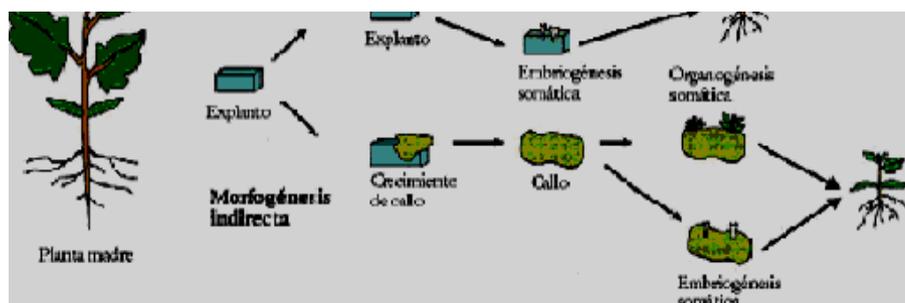
- El cultivo de embriones: Aislamiento de embriones cigóticos propiciando su crecimiento como planta en un medio artificial
- La embriogénesis somática o asexual: Generación de embriones a partir de tejidos somáticos, como microesporas u hojas
- La organogénesis: Generación de órganos como tallos o raíces a partir de diversos tejidos<sup>4</sup>

La mejora genética de las plantas cultivadas en procura de incrementar la producción viene siendo practicada por el ser humano desde hace miles de años, seguramente desde el inicio mismo de la agricultura<sup>2</sup>. Para ello, el hombre ha empleado los cruzamientos con el fin de incrementar la variabilidad genética, paso inicial en el proceso de mejoramiento.

De esta manera la hibridación entre especies diferentes permitió aumentar de modo significativo la productividad de diversos cultivos, como por ejemplo los cereales<sup>3</sup>. Sin embargo en otros cultivos esta estrategia no resultó exitosa a causa de esterilidad sexual o incompatibilidad genética<sup>1</sup>.

### 1.1.1 Hibridación Somática

La hibridación es la acción de fecundar dos individuos de distinta constitución genética, es decir, cruzar dos variedades o especies diferentes para conseguir reproducir en la descendencia alguno de los caracteres parentales<sup>9</sup> como se puede observar en la Fig 1, en la que se puede ver las etapas de la organogénesis somática que se produce.



De la combinación de los caracteres genéticos parentales se derivan también otros rasgos indeseados<sup>5</sup>, es por ello que tras la hibridación suele ser necesario realizar un proceso de selección artificial durante varias generaciones, eliminando así aquellas plantas que sostengan rasgos desfavorables para que predominen sólo los deseados<sup>7</sup>.

La hibridación somática es la obtención de plantas híbridas a partir de la fusión de células o de protoplastos derivados de células somáticas, surgió hace unos 30 años como una herramienta muy promisoría para sortear problemas de incompatibilidad precigótica<sup>2</sup>, pues como se verá más adelante de manera más detallada a nivel de protoplastos se eliminan por completo las barreras de incompatibilidad.

Esta técnica, si bien presenta algunas limitaciones, como una elevada esterilidad o imposibilidad de regenerar plantas en algunos casos, demostró ser útil para la obtención de híbridos (**cíbridos**)<sup>5</sup>.

La técnica de fusión de protoplastos se desarrolló en la década de 1950-60, a partir de la observación de que ciertos virus pueden inducir la fusión de células animales<sup>4</sup>. Sin embargo, recién en la década de 1980-90 tuvo un mayor auge debido a la aparición de métodos químicos y físicos más apropiados para la fusión de células vegetales.

La fusión de protoplastos normalmente es rara debido a la fuerte carga negativa de la superficie del protoplasto en un 97% de las especies vegetales descubiertas, de los cuales el 13% restante representa a especies que aun no

comprobadas poseen una carga superficial positiva debido a la presencia de los polisacáridos esenciales que los complementan<sup>5</sup>; pero en presencia de polietilenglicol (PEG) los protoplastos se agregan y se produce la fusión acompañada por intercambio de DNA<sup>7</sup>. Después de la fusión se permite la regeneración de la pared celular de tal manera que en la progenie regenerada exista un número significativo de recombinantes<sup>8</sup>.

La fusión de protoplastos no tiene limitaciones por barreras de incompatibilidad, siendo estas barreras precigóticas, es decir, permite que se produzca la fecundación, dado que este proceso es no específico, permitiendo la fusión de células de orígenes muy diversos, incluso de organismos muy distanciados filogenéticamente<sup>5</sup>.

Ello no significa que pueda regenerarse un organismo viable y fértil a partir de cualquier tipo de combinación entre células. De hecho, la búsqueda de híbridos de interés agronómico ha demostrado que el principal aporte de esta metodología es la introgresión<sup>3</sup>, en los cultivos, de genes provenientes de plantas silvestres emparentadas.

---

En la hibridación somática se fusionan dos protoplastos con sus genomas completos ( $2n + 2n$ ) o con uno de ellos conteniendo solo parte de su genoma<sup>4</sup>, en este tipo de hibridación se combinan organelas de ambos progenitores, produciendo nuevas combinaciones de genes citoplasmáticos<sup>3</sup>.

Un protoplasto vegetal puede definirse como la parte de la célula vegetal que está delimitada e incluida dentro de la pared celular y que puede ser

plasmolisada y aislada por eliminación mecánica o enzimática de la pared celular<sup>5</sup>. El protoplasto es por lo tanto una célula desnuda, rodeada por su membrana plasmática, potencialmente capaz de regenerar la pared celular, crecer y dividirse.<sup>4</sup>.

Los protoplastos son obtenidos de muy diversas partes de la planta, cultivadas tanto *in vitro* como *ex vitro*. Se puede obtener protoplastos de tejidos de callo, ápices de raíz, cladodios, ápices de tallo, frutos, nódulos de raíces, coleóptiles, láminas de aleurona de cereales, microsporas e incluso de tubos polínicos, pero en la actualidad la fuente de protoplastos más habitual es el tejido de mesófilo de las hojas jóvenes<sup>8</sup>.

Los protoplastos son una herramienta fundamental para la investigación en biología fundamental y aplicada. La ausencia de una pared celular rígida (obstáculo físico-químico)<sup>7</sup> y la completa exposición de la membrana celular convierte a los protoplastos en un sistema ideal para la investigación en procesos de transporte y división celular, morfogénesis, mutagénesis, selección, etc.

La preponderancia que han tomado las técnicas de transformación genética ha relegado a la hibridación somática a un papel de menor significación como herramienta biotecnológica aplicada al mejoramiento de los cultivos<sup>4</sup>.

En la transformación genética se incorporan uno o pocos genes exógenos en una planta<sup>3</sup>, mientras que en la hibridación somática el número de genes introducidos es mayor dado que se transfieren cromosomas de una especie a otra o se combinan dos genomas completos<sup>4</sup>.

La hibridación somática permite transferir caracteres sin necesidad de contar con un conocimiento detallado de los mecanismos moleculares que determinan la expresión de dichos caracteres<sup>4</sup>. Por el contrario, la transformación genética requiere la previa identificación y aislamiento de los genes que determinan la expresión del carácter de interés<sup>5</sup>.

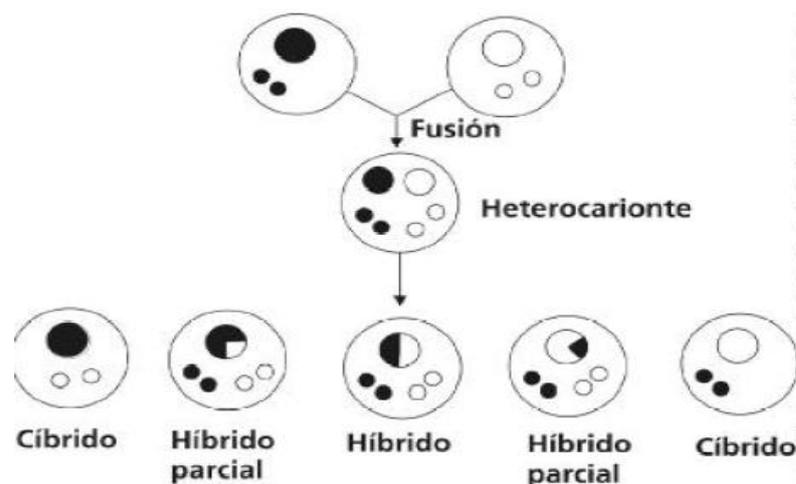
Caracteres tales como productividad, tolerancia a ciertos tipos de estrés, resistencia horizontal a enfermedades y otros son poligénicos, por lo que su transferencia es factible por hibridación somática pero no por transformación genética<sup>5</sup>.

### **1.1.2 Tipos de híbridos somáticos**

Cuando se realiza la fusión de protoplastos se obtienen células con el aporte de cromosomas de dos o más núcleos<sup>3</sup>. Si los protoplastos involucrados en la fusión proceden de distintos tipos parentales se originan «**heterocariones**», y si proceden del mismo tipo parental se originan «**homocariones**»<sup>4</sup>.

Cuando en el heterocarión ocurre la fusión de los núcleos (**cariogamia**), se forma una «**célula híbrida**»<sup>3</sup>. A partir de una célula híbrida, que contiene dos genomas completos como se muestra en la figura 2, se puede regenerar una planta que, según cual haya sido el destino del material genético nuclear durante las divisiones celulares que siguen a la fusión, puede ser de tres tipos:

- 1.1.2.1 **Híbrido simétrico**, que tiene el genoma nuclear completo de cada tipo Parental<sup>5</sup>.
- 1.1.2.2 **Híbrido asimétrico**, que tiene el genoma nuclear completo de uno de los parentales y sólo una parte del genoma nuclear del otro parental<sup>5</sup>.
- 1.1.2.3 **Cíbrido**, que contiene el genoma nuclear completo de uno de los parentales, reteniendo sólo material genético extranuclear del otro parental<sup>4-5</sup>.



*Fig. 2 Destino del material genético nuclear y extranuclear en la fusión de protoplastos (3)*

Es usual que en el proceso de regeneración de plantas híbridas ocurra una eliminación gradual de cromosomas de uno de los tipos parentales, produciéndose de este modo híbridos asimétricos o cíbridos<sup>6</sup>. La práctica de la hibridación somática en plantas demostró que, en general, los híbridos asimétricos y cíbridos son más valiosos que los simétricos producidos entre plantas alejadas filogenéticamente<sup>5</sup>.

Por esta razón se han desarrollado métodos para inducir la hibridación asimétrica o cíbridación, alterando el genoma de uno de los protoplastos parentales<sup>6</sup>. En este caso se dice que se transfiere parte del genoma de un protoplasto donante a uno receptor. Por lo tanto, teniendo en cuenta el material de partida empleado para la fusión, pueden producirse tres tipos de células híbridas:

**1. Células híbridas simétricas**, por fusión de dos protoplastos con sus genomas completos.<sup>6</sup>

**2. Célula híbrida asimétrica**, por fusión de un protoplasto conteniendo su genoma completo con otro conteniendo su núcleo inviable o sólo una parte de su genoma nuclear. Los protoplastos donantes son irradiados con rayos X o Gamma, lo que provoca la fragmentación de los cromosomas.<sup>5</sup>

Una vez producida la fusión, dichos fragmentos tienden a eliminarse en las sucesivas mitosis, pero algunos de ellos pueden integrarse con el genoma del receptor produciendo un híbrido asimétrico<sup>4</sup>.

También puede producirse una célula híbrida asimétrica fusionando protoplastos receptores con microprotoplastos<sup>6</sup>, conteniendo uno o pocos cromosomas. Los microprotoplastos se obtienen induciendo la formación de micronúcleos por tratamientos con agentes antimicrotúbulos<sup>4</sup>.

**3. Cíbridos**, por fusión de un protoplasto conteniendo su genoma nuclear completo con un protoplasto enucleado o con su núcleo inviable<sup>5</sup>.

Los protoplastos enucleados o citoplastos pueden obtenerse centrifugando los mismos a alta velocidad en un gradiente de densidad isosmótico<sup>7</sup>. Los protoplastos que poseen su genoma nuclear completo (receptores), pueden ser tratados previamente con inhibidores metabólicos<sup>6</sup>.

En este caso sólo pueden sobrevivir, por complementación metabólica, los heterocariones conteniendo el núcleo del receptor y el citoplasma del donante enucleado<sup>7</sup>.

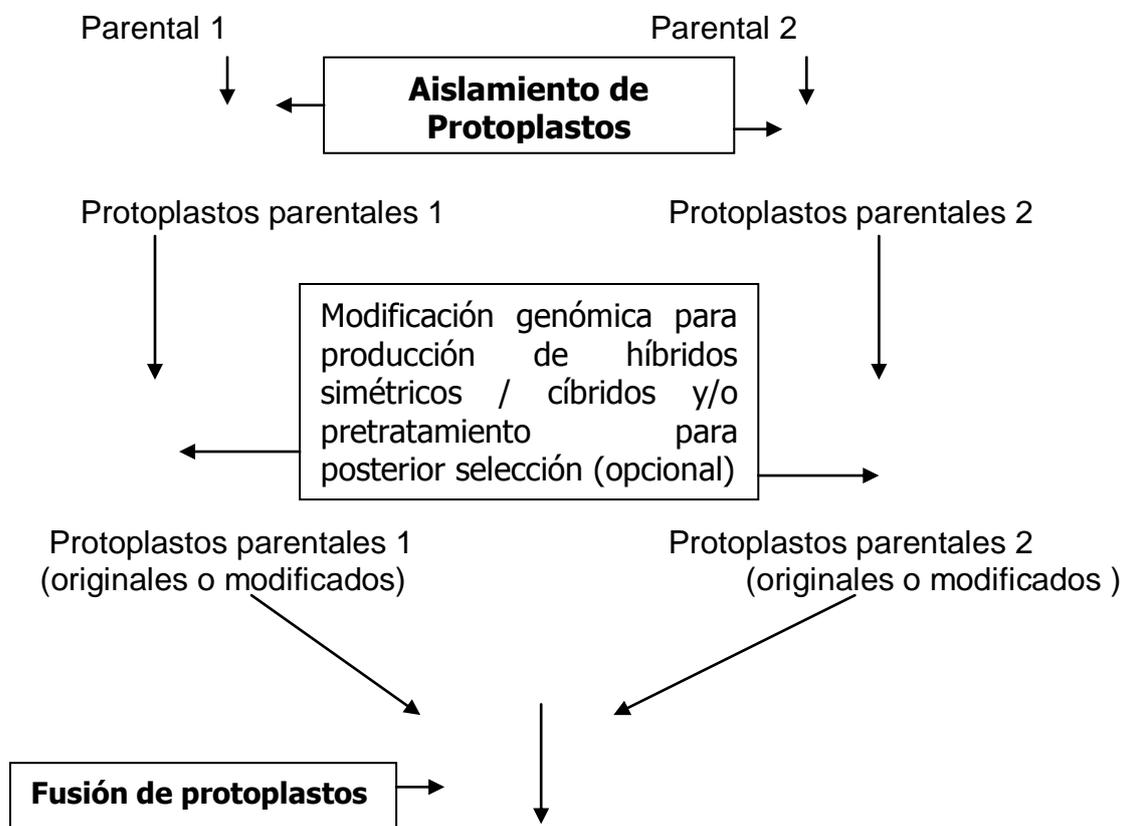
La segregación de los plástidos y mitocondrias de los dos tipos parentales también constituye una fuente importante de variabilidad en la regeneración de plantas híbridas<sup>6</sup>.

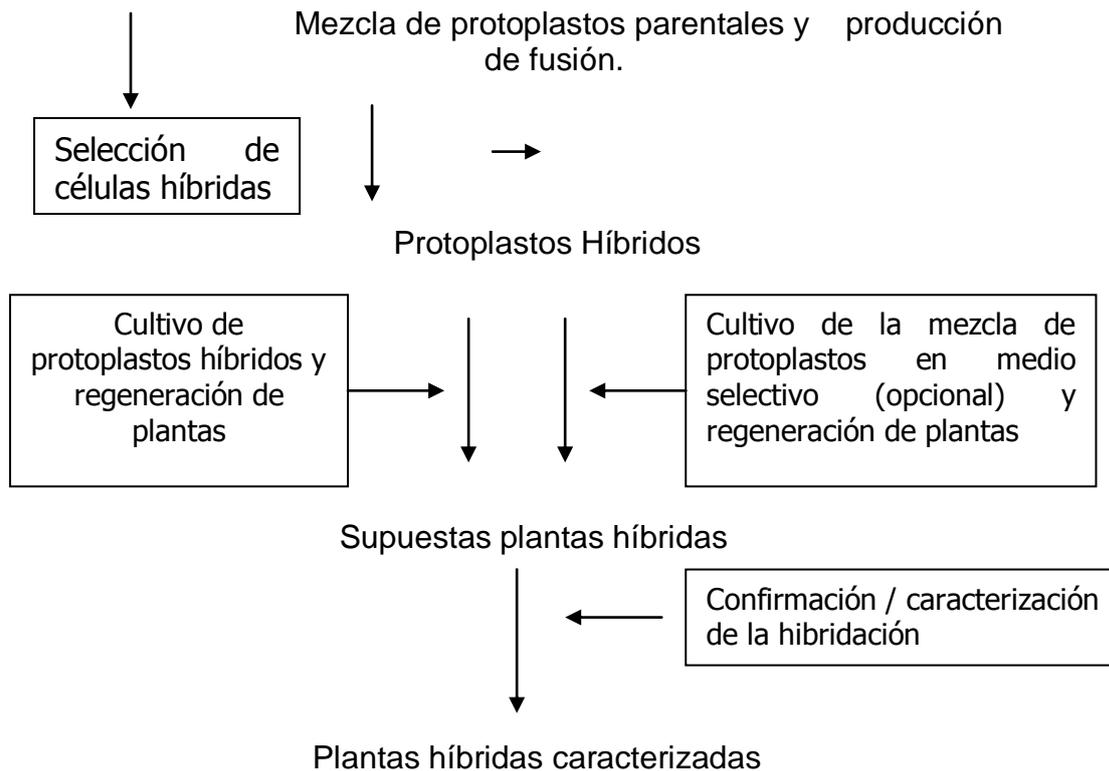
Es frecuente que ocurran recombinaciones de los genomas mitocondriales de ambos tipos parentales, pero ello es poco común entre plástidos<sup>7</sup>. Dado que las organelas segregan independientemente unas de

otras, la regla es que al cabo de pocas divisiones mitóticas las células formadas contengan plástidos provenientes de uno u otro tipo parental.

Así, una célula híbrida origina una colonia de células que exhiben diferentes combinaciones de genes citoplasmáticos, pero con una mayor frecuencia de células que poseen mitocondrias recombinantes y plástidos de uno u otro tipo parental como se explica en la figura 3.

El destino que sufre el material genético nuclear y extranuclear durante las divisiones celulares determina que, a partir de una población de células híbridas similares<sup>5</sup>, se puedan regenerar plantas con diferentes combinaciones de genes nucleares, plastídicos y mitocondriales.





**Fig. 3** Materiales y procesos involucrados en la hibridación somática (6)

<sup>8</sup>La fusión de protoplastos entonces se utilizó con los siguientes fines:

- a) **Recombinación interespecífica** de cepas que carecen de sistema sexual o parasexual, cuya frecuencia de recombinación es demasiado baja.
- b) **Hibridación interespecífica** para obtener organismos completamente nuevos capaces de sintetizar metabolitos modificados.

### 1.1.3 Hibridación Interespecífica

Los híbridos suelen mostrar mayor vigorosidad que los parentales, lo que da lugar a un mayor rendimiento. Este fenómeno ha sido aprovechado en la producción a gran escala de determinados cultivos tales como el maíz, aunque también es apreciable la contribución que las semillas híbridas han supuesto en numerosas variedades de hortalizas y plantas ornamentales<sup>8</sup>.

La Hibridación Interespecífica consiste en el cruce entre individuos de diferentes especies, considerándose así como una verdadera hibridación. En las plantas alógamas, todo individuo es un híbrido, de suerte que muchos de sus genes son heterocigóticos<sup>11</sup>. La instauración de la homocigosis por autofecundación artificial es acompañada por el efecto de endogamia o “inbreeding”: los descendientes son mucho menos vigorosos y menos productivos que la planta madre<sup>10</sup>. Las líneas obtenidas serán puras pero débiles, inutilizables directamente como variedad.

A este fenómeno de depresión provocado por la consanguinidad se opone el efecto inverso; la **heterocigosis**<sup>11</sup> producida al cruzar dos líneas endógamas, los descendientes híbridos tendrán el vigor rápidamente restablecido. Se utiliza esta técnica para producir variedades híbridas de primera generación nada más, cuyas semillas deberán ser rescatadas cada año porque ellas no se reproducirán (esto vale también para las plantas autógamas cruzadas artificialmente)<sup>12</sup>.

Se debe señalar que una vez obtenidos híbridos somáticos interespecíficos por fusión de protoplastos y regeneración de los productos seleccionados, estos híbridos van a ser distintos a los híbridos obtenidos

sexualmente. <sup>4</sup>Las plántulas obtenidas por fusión somática, pueden ser a nivel nuclear de varios tipos:

---

- a) Híbridos somáticos típicos
- b) Poliploides
- c) Aneuploides (híbridos asimétricos)
- d) Híbridos con el contenido nuclear de un parental y fracciones de información genética del otro parental<sup>4</sup>.

A nivel citoplásmico las plantas híbridas pueden presentar la suma de los  
Citoplasmas de ambos parentales (fig. 4), el citoplasma de un solo parental, un  
citoplasma híbrido resultado de la recombinación de los genomas  
extranucleares de ambas células<sup>6</sup>.

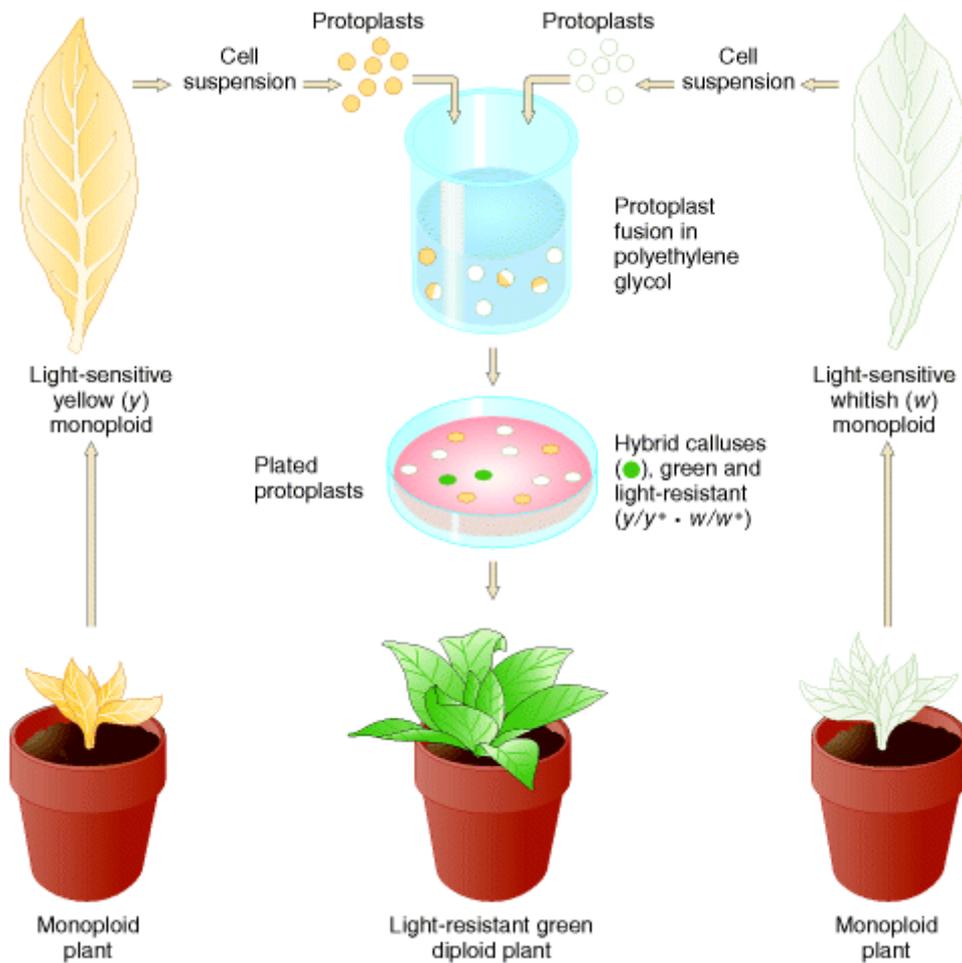


Fig. 4 Representación de la Técnica de Fusión de Protoplastos (27)

#### 1.1.4 Intervención del ADN en el proceso de Hibridación

La evolución de las modernas tecnologías utilizando células vegetales para la regeneración de plantas, ha contribuido de manera significativa en el incremento de potencial genético.<sup>15</sup>

Las técnicas tradicionales de hibridación mezclaron durante varios años miles y miles de genes y muchas generaciones de plantas con el fin de obtener una característica deseada<sup>18</sup>.

Los protoplastos constituyen los receptores más apropiados para la transferencia de genes, macromoléculas y organelos celulares de preferencia cloroplastos o mitocondrias<sup>16</sup>, y por consiguiente la posible incorporación a una células de un nuevo control genético para producir nuevas enzimas y otros componentes deseados.

Los protoplastos son las estructuras ideales para la transferencia de genes como se muestra en la Fig. 5, ya que el ADN tiene libre acceso a las membranas plasmáticas libres y a todos los receptores libres en una población, y además cada protoplasto ha pasado por un procedimiento de aislamiento<sup>16</sup>.

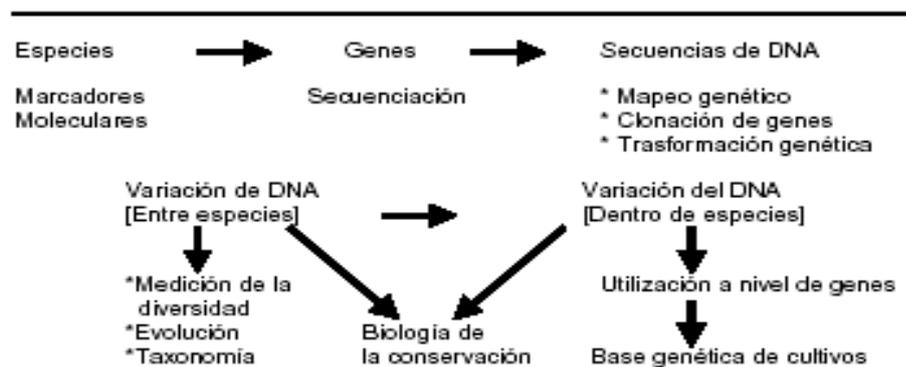


Fig. 5 . Distribución de Técnicas en las que interviene el ADN como herramienta genética.(53)

Es relevante destacar que, los fines del mejoramiento genético, el sistema de protoplastos no sólo se emplea para la obtención de híbridos somáticos, sino que también constituye un material apropiado para la incorporación de ADN exógeno<sup>4</sup>. Asimismo, la fusión de protoplastos tiene un uso mucho más amplio que el estrictamente de interés agronómico; en tal sentido, es de gran utilidad en estudios de biología celular así como para otras aplicaciones biotecnológicas, por ejemplo, la producción de anticuerpos monoclonales<sup>6</sup>.

### **1.1.5 Determinación de la Compatibilidad celular y sexual entre ambas especies.**

#### **1.1.5.1 Cruzamientos interespecíficos**

Durante la evolución se han desarrollado variaciones cromosómicas y defensas celulares que limitan o impiden el cruzamiento interespecífico; incluso, estas barreras al cruzamiento pueden desarrollarse dentro de la misma especie, debido a la presencia de genes gametofíticos que previenen el cruzamiento.<sup>49</sup>

El rescate de embriones y la fusión de protoplastos son dos formas posibles de eliminar las barreras de compatibilidad sexual y celular a nivel de gametofitos de plantas, que no existe a nivel de esporofitos<sup>49</sup>. Mediante el rescate y cultivo de embriones, pocos días después del cruce, se pueden obtener plantas híbridas viables<sup>50</sup>, mientras que durante el aislamiento y cultivo de protoplastos, se obtienen plantas que rara vez son viables, pues el porcentaje de que una planta sea viable dentro de este período es del 0.1 – 0.5%<sup>49</sup> lo que quiere decir que no tiene mayor incidencia.

Si estos embriones se dejaran crecer en su medio original el embrión abortaría por efectos gametofíticos adversos del endospermo. El cultivo de embriones se utilizaría para lograr cruces entre la especie cultivada y sus ancestros o parientes silvestres, en los cuales existan barreras para el cruzamiento interespecífico, como lo ocurrido con la cruce de *Lupinus mutabilis* x *Lupinus hartwegii*, o entre *Phaseolus vulgaris* x *P. Acutifolius*<sup>50</sup>. En este último

caso, se ha logrado obtener plantas híbridas fértiles en gran cantidad para el fitomejoramiento mediante el rescate de embriones .

Cruzas interespecíficas mediante la fusión de protoplastos, permite la fusión de los protoplastos de diferentes especies de la misma manera el intercambio de cromosomas y ADN entre las dos especies debido a que las barreras de incompatibilidad a nivel celular y sexual desaparecen por completo<sup>49</sup>, por lo que este sistema ofrece el potencial de crear recombinaciones útiles para la formación de híbridos somáticos. Sin embargo, la regeneración de microcallos es muy fácil pero la de plantas después de la fusión es más difícil de obtener; un ejemplo claro es la hibridación de papa y tomate<sup>51</sup>.

Es posible efectuar la transferencia de cloroplastos y mitocondrios de células de una especie a otra, lográndose que los cloroplastos exógenos se mantengan dentro del protoplasma de la célula huésped<sup>50</sup>. Es más difícil lograr la transferencia de mitocondrios por su tamaño pequeño. Sin embargo, esta transferencia se facilitaría al trasladar dichos organelos incluidos dentro de microprotoplastos para su transferencia a otras células.<sup>51</sup>

Por otro lado la combinación de DNA lo que conlleva es a la creación de diferentes características, siempre y cuando alguna de ellas no sea dominante sobre alguna otra<sup>47</sup>, pues en el caso que exista una dominancia entre alguna de estas, esto se verá reflejado en el individuo final.<sup>41</sup>

La compatibilidad sexual a diferencia de la compatibilidad celular no interviene de manera directa el intercambio de DNA pues si bien este se encuentra contenido en los cromosomas<sup>48</sup>, en este caso será el número cromosómico quien determine si existe o no una compatibilidad sexual entre especies.

Si una especie vegetal, contiene un número cromosómico similar a otra tiene un alto índice de compatibilidad sexual, en este caso se podría mencionar que si una planta de pera tiene un número cromosómico de 16X y una manzana un número cromosómico de 15X, su tasa de compatibilidad va a ser de un 85% sobre las variantes, lo que quiere decir que si existe compatibilidad<sup>48</sup>.

Al contrario si se quisiera unir una pera con un número cromosómico de 16X y se quiere unir con un plátano que contiene un número cromosómico de 13X<sup>48</sup>, esto será totalmente incompatible sexualmente, pues su número cromosómico dista por completo de una especie a otra.<sup>44</sup>

La compatibilidad sexual es una parte de la genética muy compleja, pues para lograr determinar si una especie es compatible con otra, se la puede determinar por el número cromosómico por simple investigación<sup>47</sup>, pero ya en el campo científico se determina en base a las características posteriores entre nuevas especies y esto llevaría años de estudio.

A nivel de campo es muy importante tener conocimiento de el número cromosómico para saber si se sigue una investigación con resultados confiables pues, el factor de  $\pm 2^{37}$  para determinar si una planta es compatible con otra, ha llevado a los investigadores años determinar la existencia de este factor, pero se han encontrado evidencias significativas de que las plantas que se encuentran dentro de

este rango son genéticamente compatibles y modificables, abiertas a aceptar nuevas características.<sup>47</sup>

## **1.1.6 Determinación del Número Cromosómico de Especies Vegetales**

### **1.1.6.1 Conteo Cromosómico en células somáticas**

La *Petunia nictaginiflora*, tanto como la *Rosa* (*Rosa* sp), poseen un rango amplio en la variación de características como por ejemplo, el color de la flor, el tipo de flor o la pigmentación heredada por los cromosomas paternos, sin embargo se han utilizado como recursos genéticos para estudios posteriores a ambas especies, principalmente para determinar barreras de incompatibilidad sexual.

El número cromosómico de la *Petunia nictaginiflora*, es de  $(2n=18)^{62}$ , mientras que de la *Rosa* sp., es de  $(2n = 22)^{63}$ , ambas son poliploides, esto se determinara de acuerdo al número cromosómico en las células somáticas y/o sexuales<sup>64</sup>. Sin embargo se puede hacer un conteo de cloroplastos en los estomas en las hojas, obteniendo un estimado rápido del número cromosómico.

Para el presente trabajo, se propone realizar la determinación del número cromosómico a nivel de raíces que son tejidos meristemáticos en crecimiento activo, utilizando la técnica del aplastamiento ("squash")<sup>64</sup>, siendo esta la más utilizada debido a su rapidez y simplicidad, encontrando algunas variantes en las etapas de pretratamiento, fijación y tinción, de los reactivos que se emplean.

#### **1.1.6.1.1 Técnica de Aplastamiento para determinación de número cromosómico.**

**a) Recolección de muestras:** Para esta parte del protocolo, se debe extraer raíces jóvenes que mantengan la humedad necesaria, con el fin de que las raíces se mantengan en desarrollo activo<sup>64</sup>, mientras más joven sea la muestra recolectada, se podrá realizar un conteo de los cromosomas de manera fácil y rápida.

Corte aproximadamente 5 mm de la parte terminal o puntas de las raíces que tienen un color hialino y luego coloque estas en la solución que se usa como pre – fijador<sup>64</sup>.

#### **b) Pre - fijación**

Para el desarrollo de esta etapa del proceso de conteo de cromosomas, se puede utilizar 8- hidroxiquinolina que es el que en este caso se empleará por su mejor actividad, el alfa bromonaftaleno o el uso de agua a 0°C<sup>64</sup>, permitiendo la contracción de los cromosomas durante la profase, facilitando así el conteo cromosómico. Se debe mantener todos los materiales a emplearse, libres de detergentes o de otros productos químicos nocivos.

#### **c) Fijación**

Para obtener una buena fijación del núcleo y de los cromosomas, así como para mantener la integridad estructural del citoplasma y de las células en general, se emplean fijadores deshidratantes. Los más empleados son mezclas de alcohol etílico con ácido acético, propiónico o láctico<sup>64</sup>.

Es importante tener en cuenta que la preparación para la fijación tiene una reacción rápida expuesta a temperatura ambiental, formando un éster, dejando por completo el efecto de fijador, por lo que se recomienda preparar el fijador cuando se vaya a emplear.

#### **d) Hidrólisis**

El objetivo de esta etapa del protocolo es la de romper las peptinas que unen las células y facilitar el aplastamiento; para esto se emplea HCl 1N a una temperatura de 60°C, recomendándose calentar el ácidos antes de colocar las raíces en la solución.<sup>64</sup>

#### **e) Aplastamiento**

En esta parte del proceso, se debe colocar de una a tres raíces sobre un porta objeto y cortar la punta en una longitud aproximada de 1 mm, que se espera y tenga un color más oscuro<sup>64</sup>. Se coloca una gota de colorante fresco y se debe descartar el resto de la raíz, colocar el cubre objeto y ligeramente aplastar con el fin de extender el tejido.

Calentar el portaobjeto pasándolo de 2 –3 veces sobre la llama de un mechero de alcohol e inmediatamente inviértalo sobre papel filtro<sup>64</sup>, de tal manera que el cubre objeto quede en contacto con el papel.

Coloque otro papel filtro sobre el portaobjeto y presiónelo fuertemente con el pulgar para aplanar las células, evitando que el porta objetos se tenga movimiento lateral, finalmente vuelva a pasar la preparación por la llama del mechero y observar los resultados al microscopio.

## CAPITULO II

### **2.1 Materiales y Métodos**

#### **2.1.1 Pruebas de extracción de protoplastos mediante tratamientos enzimáticos**

##### **2.1.1.1 Material Vegetal**

###### **2.1.1.1.1 Obtención, preparación y desinfección del material vegetal**

Se tomó 0.5 gramos de hojas jóvenes totalmente expandidas tanto de rosa como de petunia; se dejaron en remojo durante seis horas en agua corriente. Luego se procedió a la desinfección, protocolo descrito por Cañizares (1998) y modificado por Chávez (2006).

Las hojas fueron sumergidas en una solución de jabón líquido ( 20 gotas x l<sup>-1</sup>), durante diez minutos, luego se sumergieron en una solución de Yodo ( 15 gotas x l<sup>-1</sup>) durante diez minutos, posteriormente las hojas fueron expuestas a una solución de benlate (1 g x l<sup>-1</sup>) y Bankit Co. (2.5 ml x l<sup>-1</sup>) por 20 minutos. Se lavaron las hojas con agua destilada esteril (ADE) durante 15 minutos para finalmente realizar una desinfección con NaOCl al 2% durante tres minutos.

Luego de la fase de desinfección, las hojas fueron nuevamente enjuagadas tres veces en cajas Petri con ADE, dentro de la cámara de flujo laminar que previamente fue encendida y desinfectada una hora antes de su uso.

### 2.1.1.2 Preparación de los tratamientos enzimáticos para la extracción de protoplastos

Se preparó una solución para aislamiento de protoplastos, la misma que contiene  $\text{CaCl}_2$  ( $100 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ ),  $\text{NaHPO}_4$  ( $10 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ ), Manitol ( $7300 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ ) y buffer 7 ( $60 \text{ ml} \times \text{l}^{-1}$ ), ajustando el pH a 5.8 (Szabados, 1993).

A este medio para aislamiento, se le agregó diferentes concentraciones de enzimas digestivas de la pared celular (Cuadro 1) evaluadas para cada tratamiento. Las enzimas fueron esterilizadas mediante filtración (filtro millipore  $0.45 \mu\text{m}$ ) y almacenadas a  $4^\circ\text{C}$  en un frasco color ambar (Rivera, 2004).

**Cuadro 1.** Concentraciones enzimáticas empleadas para el aislamiento de protoplastos.

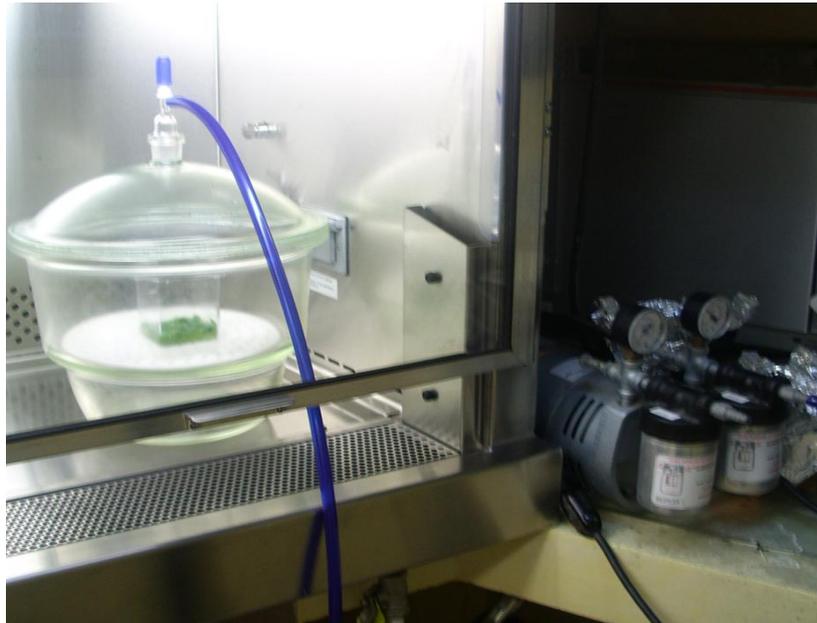
	<b>Celulasa</b>	<b>Macerozima</b>	<b>Pectoliasa</b>
<b>T1</b>	0.80%	0.05%	0.05%
<b>T2</b>	1.00%	0.5%	0.5%
<b>T3</b>	2.50%	0.5%	0.5%

### 2.1.2 Aislamiento de protoplastos

#### 2.1.2.1 Tratamiento enzimático y medio de incubación

Se procedió a realizar pequeños cortes de aproximadamente tres milímetros de largo, con el fin de obtener un mayor contacto del mesófilo con las soluciones enzimáticas.

El material se llevó a cajas magenta con diez mililitros de las diferentes soluciones enzimáticas, esta mezcla fue expuesta al vacío (500 atm) durante 30 min dentro de un desecador esteril con la finalidad de lograr que la solución enzimática penetre directamente al tejido foliar como se puede observar en la Fig. 6.



**Fig. 6.** Exposición de cortes de mesófilo con solución enzimática a vacío (500 atm)

Esta mezcla fue incubada en oscuridad entre 20 – 22°C en agitación a 90 rpm Fig.7, durante 18 horas. Para determinar el tiempo óptimo de incubación, se midió desde la primera hora hasta la 18ava hora de incubación.



Fig. 7. Incubación de muestras a obscuridad en agitación constante.

### 2.1.3 Limpieza y purificación de protoplastos

Después de la incubación de los protoplastos de ambas especies, los protoplastos fueron filtrados con un tamiz de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro con el fin de retener restos vegetales, las soluciones filtradas fueron lavadas tres veces con seis mililitros de Cell protoplast wash 13M (CPW 13M) y centrifugadas a 1000 g durante siete minutos como se muestra en la Fig. 8; eliminando el sobrenadante en cada lavado (Zanke, 1995).



Fig. 8 Fase de purificación y lavado de protoplastos mediante centrifugación con CPW 13M

## **2.1.4 Pruebas Estadísticas**

La Unidad Experimental para esta fase fue una caja Magenta con 0.5 gramos de hoja de rosa y/o petunia con diez ml de solución de aislamiento. Las pruebas estadísticas utilizadas fue Análisis de Varianza para determinar las diferencias estadísticas entre tratamientos enzimáticos y el tiempo de exposición a los mismos.

Adicionalmente se realizaron pruebas estadísticas complementarias como la discriminación de medias de Tukey al 5%, para determinar los mejores tratamientos enzimáticos. Además se realizaron regresiones en relación al tiempo – enzima – número de protoplastos.

Finalmente se determinó el tiempo óptimo de exposición a las enzimas de las hojas tanto de rosa como de petunia mediante una regresión polinómica.

## **2.1.5 Fusión de Protoplastos**

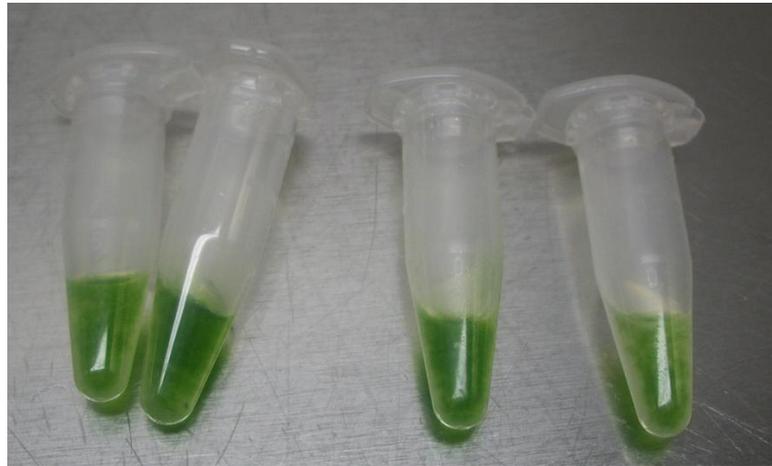
### **2.1.5.1 Fusión química de protoplastos mediante Polientilenglicol**

#### **(PEG)**

Eliminado el sobrenadante, se resuspendió una vez más los protoplastos en seis mililitros de CPW 13M dejando la solución en reposo durante diez minutos.

Se tomó una muestra de protoplastos de rosa y petunia en proporción 1:1; se colocó en un tubo eppendorf en donde se los dejó en reposo durante

seis minutos (Fig. 9); una vez transcurrido este tiempo, se puso seis gotas de Polietilenglicol (PEG) para inducir la aglutinación y la suspensión fue incubada durante 20 – 25 minutos a temperatura ambiente de acuerdo con lo establecido por Schum et al (2001).



**Fig. 9.** Reposo de protoplastos de *Rosa* sp y *Petunia nictaginiflora*, expuestos a PEG, para ser fusionados.

Para eliminar el exceso de PEG, se realizaron cuatro lavados con una solución de  $\text{CaCl}_2$  cada cinco minutos durante veinte minutos, adicionando en cada lavado 12 gotas de de  $\text{CaCl}_2$ .

### **2.1.6 Medios para cultivo de protoplastos fusionados**

Una vez que se han completado los lavados con  $\text{CaCl}_2$ , se deja los tubos en reposo en forma vertical, con el fin de formar una interfase (Fig. 10), de la que se extraerán protoplastos para el cultivo.

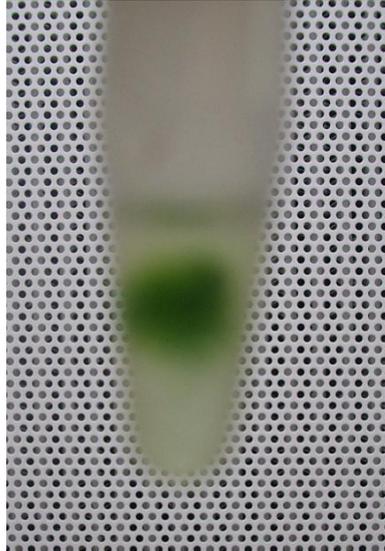


Fig. 10. Formación de interfase de protoplastos fusionados

Se extrajo la interfase con ayuda de una pipeta automática para luego ser dispensar los protoplastos que fueron fusionados en dos medios sólidos; Murashige & Skoog (MS) (Anexo1) y MS + V200 – G (Anexo2); las cajas con el medio sembrado de protoplastos fueron selladas con parafilm e incubadas a 25°C en obscuridad durante un mes y medio (Hiroyuki,2002).

## **2.1.7 Determinación del Número Cromosómico de *Rosa sp* y *Petunia nictaginiflora*.**

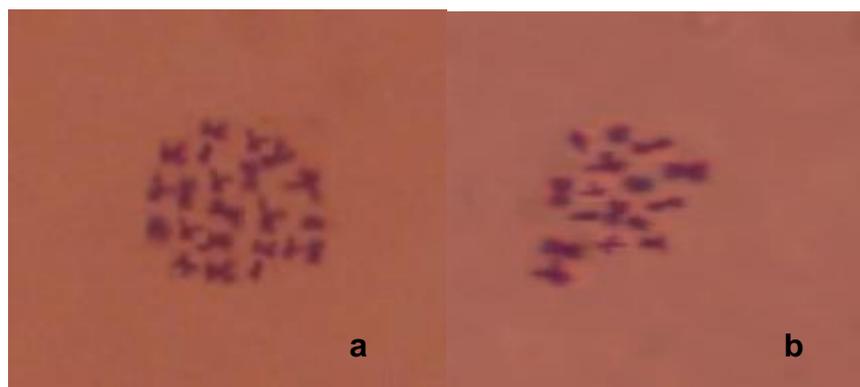
### **2.1.7.1 Conteo Cromosómico en células somáticas**

Para determinar el número cromosómico de rosa y petunia, se seleccionó material radicular joven, luego en laboratorio fue lavado con ADE; posteriormente las raíces fueron seccionadas en aproximadamente un cm, las secciones fueron tratadas durante cinco horas en una solución de 8 – hidroxikinoleina 2mM, a una temperatura de 20°C.

El material radicular fue extraído de la solución de 8 – hidroxikinoleina, para ser suspendido en una solución de ácido acético – etanol (3:1) e incubado por 12 horas a temperatura ambiente.

Concluido el tiempo de incubación se tomó el material radicular, para ser hidrolizado en 1N de HCl a 60°C durante 20 minutos (Taguchi, 1993), con el fin de suavizar el material.

El producto de la hidrolización se colocó en un porta objeto adicionando tres gotas de Orceina acética al 2%; este material fue disgregado con ayuda de una aguja de disección, una vez que fue disgregado completamente el material radicular, se colocó el cubre objeto, se lo cubrió con papel secante y finalmente se realizó un squash con el fin de extender el tejido, finalmente la preparación fue flameada para su observación al microscopio para selección y fotografiado de cromosomas metafásicos (Fig. 11) para armar los respectivos cariotipos.



**Fig. 11.** Cromosomas metafásicos de rosa (a) y petuía (b).

## CAPITULO III

### 3.1 Resultados y Discusión

#### 3.1.1 RESULTADOS

##### 3.1.1.1 Aislamiento y Purificación de Protoplastos a partir de hojas de *Rosa sp*

Para el aislamiento de protoplastos se probaron tres tratamientos enzimáticos T<sub>1</sub> (Celulasa 0.8%, Macerozima y Pectoliasa 0.05%), T<sub>2</sub> (Celulasa 1%, Macerozima y Pectoliasa 0.5%) y T<sub>3</sub> (Celulasa 2.5%, Macerozima y Pectoliasa 0.5%). Con el fin de estandarizar el protocolo de aislamiento se tomaron 18 muestras para cada tratamiento cada hora. Al comparar el número de protoplastos se encontró un efecto significativo para enzimas ( $F_{2,108} = 5686.78$ ;  $p < 0.0001$ ), tiempo ( $F_{17,108} = 288.04$ ;  $p < 0.0001$ ) e interacción tiempo x enzimas ( $F_{34,108} = 74.62$ ;  $p < 0.0001$ ).

Al analizar el efecto de las enzimas sobre el número de protoplastos se determinó que el T<sub>3</sub> (Celulasa 2.5%, Macerozima y Pectoliasa 0.5%) presentó mayor cantidad de protoplastos que los tratamientos T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> (Tabla 1).

**Tabla 1.** Promedio  $\pm$  error estándar del número de protoplastos obtenidos de hojas de *Rosa* sp bajo el efecto de tres tipos de enzimas, IASA, Ecuador, 2006 (letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas,  $p < 0.05$ ).

ENZIMA	# Protoplastos
1.00	10092,59 $\pm$ 1051.11 a
2.00	68000 $\pm$ 6263.50 b
3.00	153481,48 $\pm$ 9479.92 c

Al analizar el efecto del tiempo sobre el número de protoplastos se determinó que a las 12, 13 y 14 horas se encontró el mayor número de protoplastos (Tabla 2).

Para determinar el tiempo óptimo en el que se obtendrá el mayor número de protoplastos se realizó un análisis de regresión polinómica. La relación polinómica de tercer grado entre las variables se explicó por la siguiente ecuación: **# protoplastos** = - 1809.46 + 1567.6 T + 1734.7 T<sup>2</sup> - 83.82 T<sup>3</sup>.

Posteriormente se extrajo la primera derivada y se calculó el valor del tiempo óptimo de aislamiento de protoplastos de 14.23 horas, como se muestra a continuación:

## Regresión Polinómica – Tiempo Óptimo para la Recuperación de Protoplastos de

$$\# \text{ protoplastos} = - 1809.46 + 1567.6 T + 1734.7 T^2 - 83.82 T^3$$

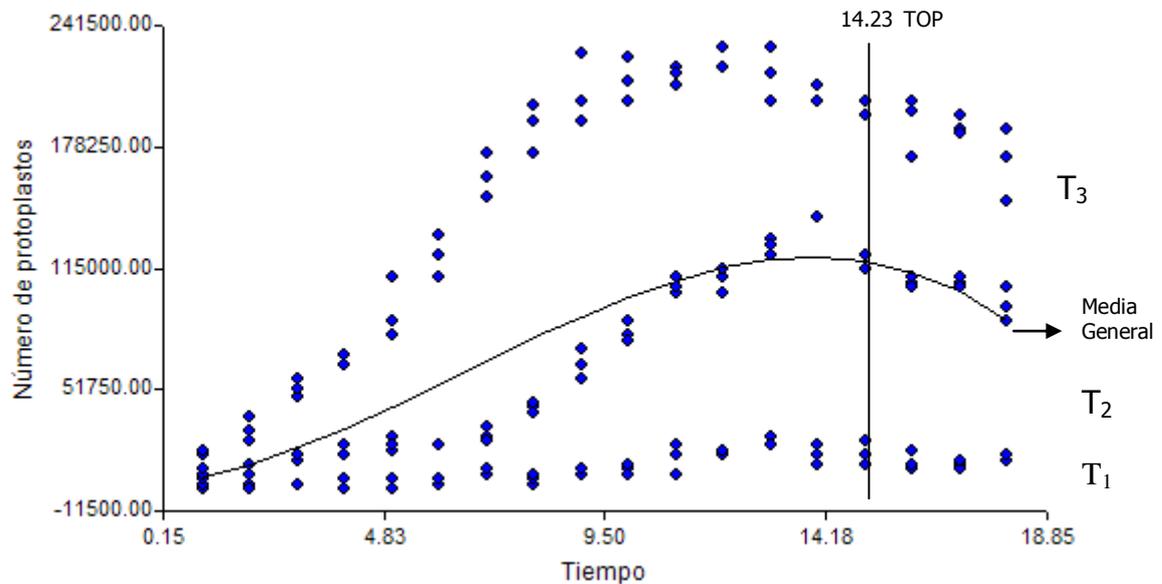
$$= 1567.6 + 3469.4 T - 251.46 T^2$$

$$= 251.46 T^2 - 3469.4 T - 1567.6$$

$$= + 14.23$$

$$= - 0.42$$

En la Fig. 12. se puede observar de manera gráfica la interacción entre el tiempo y el número de protoplastos obtenidos en cada tratamiento aplicado.



**Fig. 12.** Tiempo óptimo para el aislamiento de protoplastos de *Rosa sp* de acuerdo a los diferentes tratamientos enzimáticos.

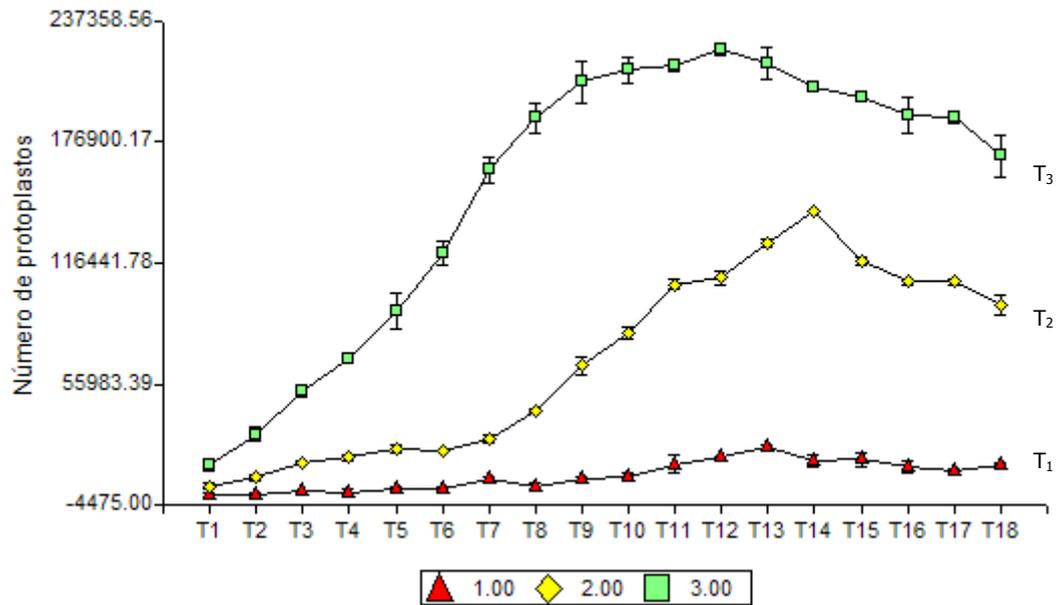
**Tabla 2.** Promedio  $\pm$  error estándar del número de protoplastos obtenidos a partir de hojas de *Rosa* sp a diferentes tiempos, IASA, Ecuador, 2006 (letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas,  $p < 0.05$ ).

Tiempo	# Protoplastos
1	7222,22 $\pm$ 2445.39 a
2	13611,11 $\pm$ 4623.14 ab
3	23888,89 $\pm$ 7489.70 bc
4	29722,22 $\pm$ 10012.53 cd
5	39722,22 $\pm$ 13778.03 de
6	49055,56 $\pm$ 18373.52 e
7	66555,56 $\pm$ 24368.76 f
8	78833,33 $\pm$ 28155.20 g
9	93444,44 $\pm$ 29723.31 h
10	101555,56 $\pm$ 29797.05 hi
11	112388,89 $\pm$ 28940.89ij
12	117166,67 $\pm$ 29576.41 j
13	122277,78 $\pm$ 27865.76 j
14	121388,89 $\pm$ 27525.59 j
15	111777,78 $\pm$ 26248.30 ij
16	104055,56 $\pm$ 25637.49 ih
17	102944,44 $\pm$ 25521.29 ih
18	93833,33 $\pm$ 22524.99 h

Al analizar el efecto de la interacción enzima x tiempo sobre el número de protoplastos, se determinó que el T<sub>3</sub> mostró mayor número de protoplastos durante las 18 evaluaciones realizadas (Tabla 3), la misma que se demuestra de manera gráfica en la Fig. 13.

En la Fig. 14 se muestra la secuencia de aislamiento de protoplastos a diferentes tiempos de exposición enzimática con T<sub>3</sub> (Celulasa 2.5%, Macerozima y pectoliasa 0.5%); en el literal a, se puede observar que a los treinta minutos de exposición enzimática se encuentran todavía células con pared celular; en el literal b y c, se encuentran protoplastos aislados en un intervalo de una a siete horas ( $2 \times 10^4$  protoplastos  $\times$  ml<sup>-1</sup>) y ( $1,75 \times 10^5$  protoplastos  $\times$  ml<sup>-1</sup>) respectivamente, es todavía muy baja la recuperación de

protoplastos aislados; finalmente en el literal d, se muestra protoplastos aislados dentro de la doceava hora de exposición enzimática con una cantidad de protoplastos aislados de  $2,41 \times 10^5$  protoplastos  $\times \text{ml}^{-1}$ .



**Fig. 13.** Tratamientos aplicados en la investigación para determinar el más óptimo por el número de protoplastos aislados

**Tabla 3.** Promedio  $\pm$  error estándar de la interacción de número de protoplastos obtenidos a partir de hojas de *Rosa* sp a diferentes tiempos bajo el efecto de tres tratamientos enzimáticos aplicados, IASA, Ecuador, 2006.

Tiempo	Enzima	# Protoplastos
1.00	1.00	833.33 $\pm$ 833.33 a
1.00	2.00	5000.00 $\pm$ 1443.38 ab
1.00	3.00	15833.33 $\pm$ 3004.63 ab
2.00	1.00	833.33 $\pm$ 833.33 bc
2.00	2.00	9166.67 $\pm$ 1666.67 bc
2.00	3.00	30833.33 $\pm$ 3632.42 cd
3.00	1.00	2500.00 $\pm$ 0.00 de
3.00	2.00	16666.67 $\pm$ 833.33 de
3.00	3.00	52500.00 $\pm$ 2886.75 de
4.00	1.00	1666.67 $\pm$ 1666.67 e
4.00	2.00	19166.67 $\pm$ 1666.67 f
5.00	1.00	3333.33 $\pm$ 1666.67 fg
5.00	2.00	23333.33 $\pm$ 2204.79 hi
5.00	3.00	92500.00 $\pm$ 9013.88 hi
6.00	1.00	3333.33 $\pm$ 833.33 hij
6.00	2.00	22500.00 $\pm$ 0.00 hij
6.00	3.00	121333.33 $\pm$ 6359.59 ij
7.00	1.00	8333.33 $\pm$ 833.33 ij
7.00	2.00	28333.33 $\pm$ 2204.79 j
8.00	1.00	5000.00 $\pm$ 1443.38 j
8.00	2.00	42500.00 $\pm$ 1443.38 jk
8.00	3.00	189000.00 $\pm$ 7371.11 jk
9.00	1.00	8333.33 $\pm$ 833.33 jk
9.00	2.00	65000.00 $\pm$ 4330.13 jk
9.00	3.00	207000.00 $\pm$ 10408.33 jkl
10.00	1.00	10000.00 $\pm$ 1443.38 kl
10.00	2.00	81666.67 $\pm$ 3004.63 kl
10.00	3.00	213000.00 $\pm$ 6658.33 klm
11.00	1.00	15833.33 $\pm$ 4409.59 klm
11.00	2.00	105666.67 $\pm$ 2333.33 lm
11.00	3.00	215666.67 $\pm$ 2962.73 lm
12.00	1.00	19166.67 $\pm$ 833.33 mn
12.00	2.00	109000.00 $\pm$ 3785.94 mn
12.00	3.00	223333.33 $\pm$ 3333.33 klm
13.00	1.00	24166.67 $\pm$ 1666.67 mn
13.00	2.00	126333.33 $\pm$ 2333.33 mno
13.00	3.00	216333.33 $\pm$ 8089.77 no
14.00	1.00	17500.00 $\pm$ 2886.75 no
14.00	2.00	142000.00 $\pm$ 0.00 no
14.00	3.00	204666.67 $\pm$ 2666.67 pq
15.00	1.00	18333.33 $\pm$ 3632.42 pq
15.00	2.00	117333.33 $\pm$ 2333.33 pq
15.00	3.00	199666.67 $\pm$ 2333.33 qr
16.00	1.00	14166.67 $\pm$ 3004.63 qrs
16.00	2.00	107333.33 $\pm$ 1452.97 qr
16.00	3.00	190666.67 $\pm$ 8950.48 rs
17.00	1.00	12500.00 $\pm$ 1443.38 rs
17.00	2.00	107333.33 $\pm$ 1452.97 rst
17.00	3.00	189000.00 $\pm$ 3055.05 st
18.00	1.00	15833.33 $\pm$ 833.33 t
18.00	2.00	95666.67 $\pm$ 5206.83 t
18.00	3.00	170000.00 $\pm$ 10785.79 t

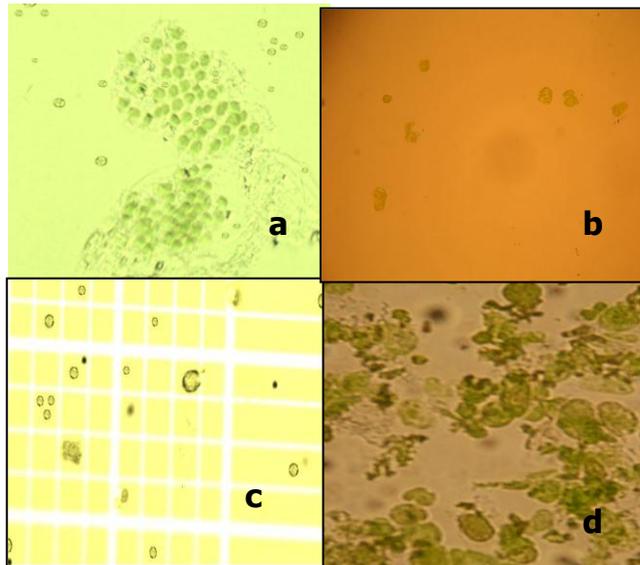


Fig.14. Aislamiento de protoplastos a diferentes tiempos de exposición enzimática con T1. a) Antes de la primera hora b) Primera hora de exposición c) Séptima hora de exposición d) Doceava hora de exposición.

### 3.1.1.2 Aislamiento de Protoplastos a partir de hojas de *Petunia nictaginiflora*.

Al igual que en aislamiento de protoplastos a partir de hojas de rosa, para petunia se aplicó la misma metodología; al realizar el análisis de varianza se encontró diferencias estadísticas para enzimas ( $F_{2,108} = 8169.58$ ;  $p < 0.0001$ ), tiempo ( $F_{17,108} = 583.70$ ;  $p < 0.0001$ ) y la interacción entre el tiempo y las enzimas ( $F_{34,108} = 138.94$ ;  $p < 0.0001$ ).

Al analizar el efecto de las enzimas sobre el número de protoplastos se determinó que el T<sub>3</sub> (Celulasa 2.5%, Macerozima y Pectoliasa 0.5%) presentó mayor cantidad de protoplastos que los tratamientos T<sub>1</sub> y T<sub>2</sub> (Tabla 4).

**Tabla 4.** Promedio  $\pm$  error estándar del número de protoplastos obtenidos de hoas de *Petunia nictaginiflora* bajo el efecto de tres tipos de enzimas, IASA, Ecuador, 2006 (letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas,  $p < 0.05$ ).

<b>ENZIMAS</b>	<b># Protoplastos</b>
1.00	9722,22 $\pm$ 1077.18 a
2.00	81194,44 $\pm$ 7772.10 b
3.00	149601,85 $\pm$ 10254.22 c

Al analizar el efecto del tiempo sobre el número de protoplastos se determinó que a las 10, 11 y 12 horas se encontró el mayor número de protoplastos (Tabla 5).

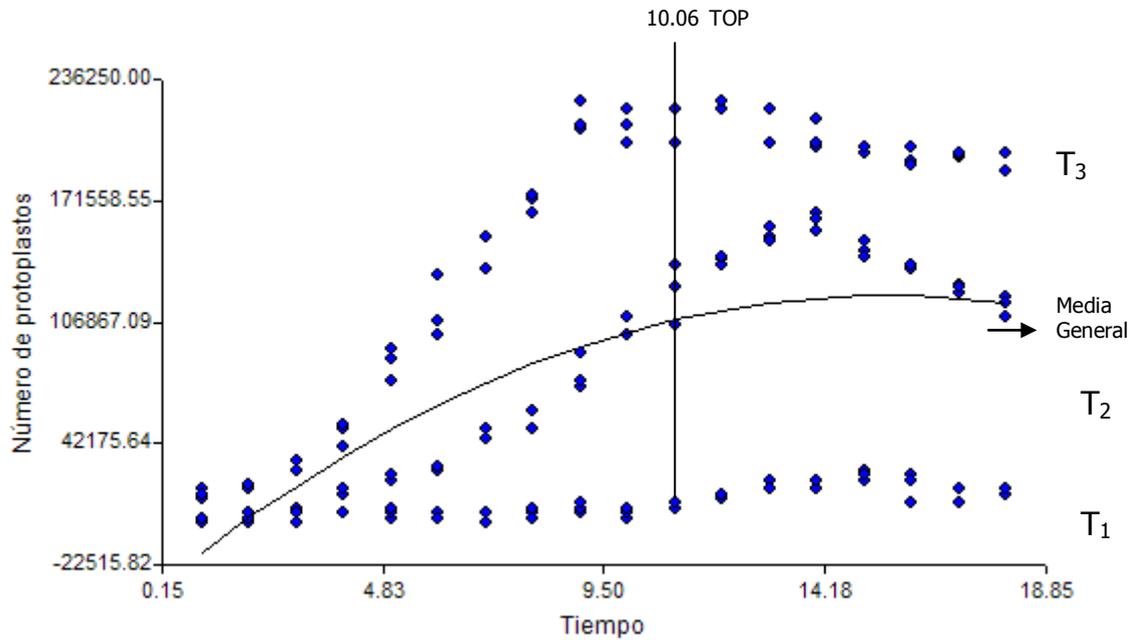
Para determinar el tiempo óptimo en el que se obtendrán el mayor número de protoplastos se realizó un análisis de regresión polinómica. La relación polinómica de tercer grado entre las variables se explicó por la siguiente ecuación: **# protoplastos** = 2361.6 + 2650.9 T + 1454.5 T<sup>2</sup> – 74.3 T<sup>3</sup>.

Posteriormente se extrajo la primera derivada y se calculó el valor del tiempo óptimo de aislamiento de protoplastos de 10.06 horas, como se muestra a continuación:

## Regresión Polinómica – Tiempo Óptimo para la Recuperación de Protoplastos

$$\begin{aligned}\# \text{protoplastos} &= 2361.6 + 2650.9 T + 1454.5 T^2 - 74.3 T^3 \\ &= 2650.9 + 2909 T - 222.9 T^2 \\ &= 222 T^2 - 2909 T - 2650 \\ &= + 10.006 \\ &= - 3.0968\end{aligned}$$

En la Fig. 15, se demuestra gráficamente la interacción entre el tiempo y el número de protoplastos para los tres tratamientos enzimáticos.

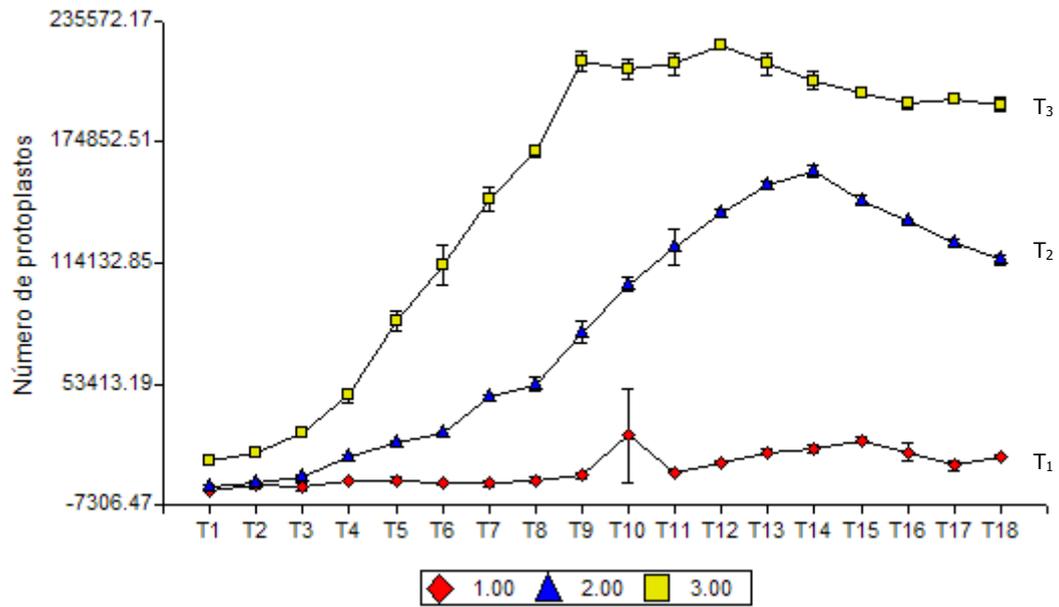


**Fig. 15.** Tiempo óptimo de recuperación de protoplastos de *Petunia nictaginiflora* de acuerdo a los diferentes tratamientos enzimáticos.

**Tabla 5.** Promedio  $\pm$  error estándar del número de protoplastos obtenidos a partir de hojas de *Petunia nictaginiflora* a diferentes tiempos, IASA, Ecuador, 2006 (letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas,  $p < 0.05$ ).

<b>Tiempo</b>	<b># Protoplastos</b>
1	5555,56 $\pm$ 7264.83 a
2	8611,11 $\pm$ 8111.63 a
3	12500 $\pm$ 12869.54 a
4	23055,56 $\pm$ 19315.54 b
5	38055,56 $\pm$ 36481.54 c
6	48222,22 $\pm$ 50490.79 e
7	65444,44 $\pm$ 63724.23 f
8	76333,33 $\pm$ 73892.24 g
9	100777,78 $\pm$ 91805.54 g
10	106555,56 $\pm$ 89546.58 gh
11	115166,67 $\pm$ 89379.11 hij
12	125722,22 $\pm$ 91196.60 kl
13	128722,22 $\pm$ 86494.98 i
14	129055,56 $\pm$ 83623.95 i
15	123222,22 $\pm$ 77243.17 jkl
16	116388,89 $\pm$ 77364.31 ijk
17	111055,56 $\pm$ 80151.59 hi
18	108666,67 $\pm$ 76923.26 ghi

Al analizar el efecto de la interacción enzima x tiempo sobre el número de protoplastos, se determinó que el tratamiento tres mostró mayor número de protoplastos durante las 18 evaluaciones realizadas, como se muestra en la Tabla 3, y de manera gráfica en la Fig. 16.



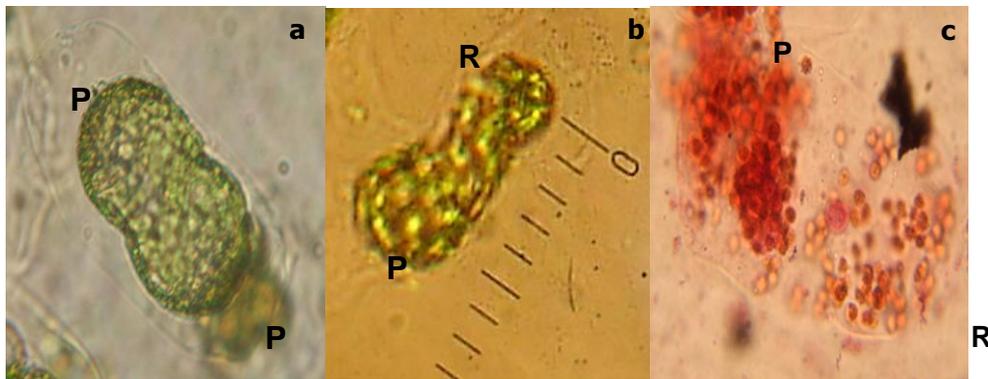
**Fig. 16.** Tratamientos aplicados en la investigación para determinar el más óptimo por el número de protoplastos recuperados

**Tabla 6.** Promedio  $\pm$  error estándar de la interacción de número de protoplastos obtenidos a partir de hojas de *Petunia nictaginiflora* a diferentes tiempos bajo el efecto de los tres tratamientos enzimáticos aplicados, IASA, Ecuador, 2006.

Tiempo	Enzimas	Protoplastos
1.00	1.00	0.00 $\pm$ 0.00a
1.00	2.00	1666.67 $\pm$ 833.33ab
1.00	3.00	15000.00 $\pm$ 1443.38
2.00	1.00	2500.00 $\pm$ 1443.38ab
2.00	2.00	4166.67 $\pm$ 833.33
2.00	3.00	19166.67 $\pm$ 833.33
3.00	1.00	1666.67 $\pm$ 1666.67
3.00	2.00	6666.67 $\pm$ 833.33
3.00	3.00	29166.67 $\pm$ 1666.67
4.00	1.00	5000.00 $\pm$ 0.00
4.00	3.00	47500.00 $\pm$ 3818.81
5.00	1.00	5000.00 $\pm$ 1443.38
5.00	3.00	85000.00 $\pm$ 5204.16
6.00	1.00	3333.33 $\pm$ 833.33
6.00	2.00	28333.33 $\pm$ 833.33
6.00	3.00	113000.00 $\pm$ 9712.53
7.00	1.00	3333.33 $\pm$ 1666.67
7.00	2.00	46666.67 $\pm$ 1666.67
7.00	3.00	146333.33 $\pm$ 5666.67
8.00	2.00	53333.33 $\pm$ 3333.33
8.00	3.00	170666.67 $\pm$ 2962.73
9.00	1.00	7500.00 $\pm$ 1443.38
9.00	2.00	79166.67 $\pm$ 5464.53
9.00	3.00	215666.67 $\pm$ 4702.25
10.00	1.00	5000.00 $\pm$ 1443.38
10.00	2.00	103333.33 $\pm$ 3333.33
10.00	3.00	211333.33 $\pm$ 5206.83
11.00	1.00	9166.67 $\pm$ 833.33
11.00	2.00	122333.33 $\pm$ 9333.33
11.00	3.00	214000.00 $\pm$ 6000.00
12.00	1.00	14166.67 $\pm$ 833.33
12.00	2.00	139666.67 $\pm$ 1452.97
12.00	3.00	223333.33 $\pm$ 1666.67
13.00	1.00	19166.67 $\pm$ 1666.67
13.00	2.00	153000.00 $\pm$ 2081.67
13.00	3.00	214000.00 $\pm$ 6000.00
14.00	1.00	20833.33 $\pm$ 1666.67
14.00	2.00	160666.67 $\pm$ 2962.73
14.00	3.00	205666.67 $\pm$ 4702.25
15.00	1.00	25000.00 $\pm$ 1443.38
15.00	2.00	145666.67 $\pm$ 2333.33
15.00	3.00	199000.00 $\pm$ 1000.00
16.00	1.00	19166.67 $\pm$ 4639.80
16.00	2.00	135666.67 $\pm$ 666.67
16.00	3.00	194333.33 $\pm$ 2962.73
17.00	1.00	12500.00 $\pm$ 2500.00
17.00	2.00	124666.67 $\pm$ 1452.97
17.00	3.00	196000.00 $\pm$ 577.35
18.00	1.00	16666.67 $\pm$ 833.33
18.00	2.00	115666.67 $\pm$ 2962.73
18.00	3.00	193666.67 $\pm$ 3333.33

### 3.1.1.3 Fusión y cultivo de protoplastos de *Rosa* sp. y *Petunia nictaginiflora*.

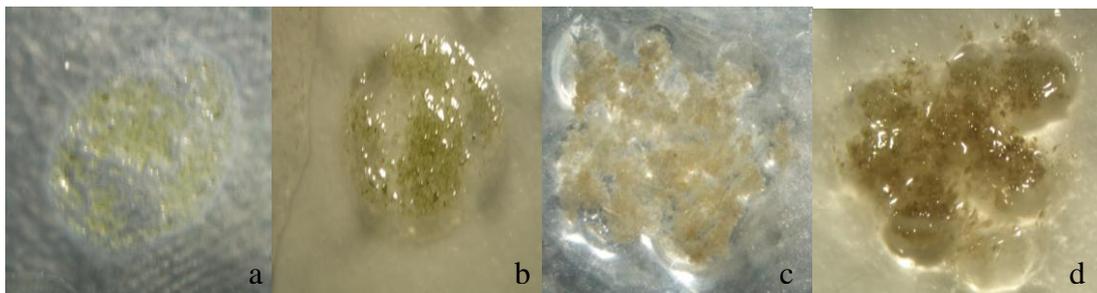
Se realizaron cuatro muestreos con el fin de evaluar la cantidad de protoplastos fusionados mediante su exposición al PEG, se obtuvo un total de  $2.87 \times 10^5$  protoplastos fusionados, mediante un conteo porcentual se obtuvo 74.78% protoplastos fusionados rosa – petunia, mientras que el restante 25.21% correspondió a protoplastos fusionados entre la misma especie, relación encontrada mediante pruebas de medida y coloración, como se puede observar en la Fig. 17, en el literal (a), se encuentra una fusión de protoplastos entre la misma especie binucleados, (b) se puede observar protoplastos fusionados de rosa – petunia medidos bajo micrómetro, y finalmente en el literal (c), encontramos protoplastos de rosa y petunia fusionados y evaluados mediante coloración.



**Fig.17.** Fusión de protoplastos, (a) fusión de protoplastos de petunia, (b) fusión de protoplastos de rosa – petunia medidos con micrómetro; (c) protoplastos de rosa – petunia evaluados mediante coloración.

Una vez que pasaron por el tratamiento de fusión con PEG se evaluaron dos medios de cultivo para protoplastos, Murashige & Skoog y Murashige & Skoog V220- G; en ambos medios los protoplastos se adaptaron formando colonias

hasta llegar al estadio de callos Fig. 18; los protoplastos en ambos medios de cultivo presentaron a los dos días la misma apariencia del momento en el que fueron colocados en este con un diámetro de 0.5 cm (a); a la primera semana presentaron una expansión debido a que aumentaron su diámetro de 0.82 cm; los protoplastos empezaron a desarrollarse y crecer (b), a partir de la tercera semana de desarrollo, los protoplastos empiezan a cambiar su coloración tornándose de color blanquesino transparente y presentan un diámetro de 1.6 cm (c), y finalmente en la cuarta semana se encontró un callo de color verdoso de 1.8 - 2 cm de diámetro(d).



**Fig. 18.** Diferentes estadios de crecimiento de protoplastos en los medios de cultivo evaluados para su crecimiento. a) Dos días de crecimiento, b) Primera semana de crecimiento de protoplastos, c) Tercera semana de crecimiento de protoplastos, d) microcallo de protoplastos fusionado.

#### **3.1.1. 4. Desarrollo del cariotipo de *Petunia nictaginiflora* y *Rosa* sp.**

En las metafases de petunia se determinó el número cromosómico de  $2n = 18$  cromosomas, y se agruparon en cuatro grupos, como se puede observar en la Fig. 19.

**Grupo A:** Un par de cromosomas metacéntricos grandes.

**Grupo B:** Tres pares de cromosomas submetacéntricos.

**Grupo C:** Dos pares de cromosomas metacéntricos medianos.

**Grupo D:** Tres pares de cromosomas telocéntricos.



**Fig. 19** Cariotipo de la petunia variedad *Petunia nictaginiflora*, número cromosómico  $2n = 18$

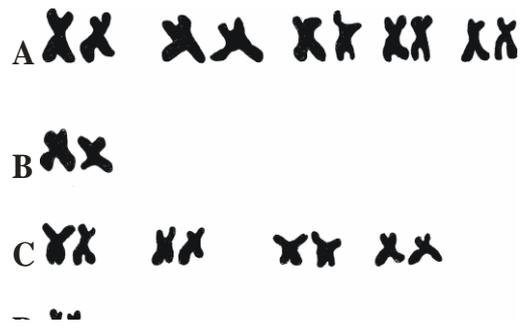
De igual manera, en los meristemos radiculares de la rosa se registró metafases con  $2n = 22$  cromosomas distribuidos en cuatro grupos como se observa en la Fig. 20.

**Grupo A:** Cinco pares de cromosomas submetacéntricos grandes.

**Grupo B:** Un par de cromosomas metacéntricos grandes.

**Grupo C:** Cuatro pares de cromosomas submetacéntricos medianos.

**Grupo D:** Un par de cromosomas metacéntricos medianos.



**Fig. 20** Cariotipo de la rosa variedad *Rosa* sp., número cromosómico  $2n = 22$

### 3.1.5 DISCUSIÓN

En los experimentos realizados se observó que el procedimiento aplicado resultó satisfactorio para el aislamiento de protoplastos tanto de rosa como de petunia dentro de la misma concentración enzimática (Celulasa 2.5%, Macerozima y pectoliasa 0.5%), para lo que se evaluó las enzimas en diferentes concentraciones para tres tratamientos diferentes, T<sub>1</sub> (Celulasa 0.8%, Macerozima y pectoliasa 0.05%), T<sub>2</sub> (Celulasa 1%, Macerozima y pectoliasa 0.5%) y finalmente T<sub>3</sub> (Celulasa 2.5%, Macerozima y pectoliasa 0.5%).

El T<sub>3</sub> (Celulasa 2.5%, Macerozima y pectoliasa 0.5%) fue el más eficiente debido a que se logró recuperar una mayor cantidad de protoplastos aislados tanto para rosa ( $2.4 \times 10^5$  protoplastos  $\times$  ml<sup>-1</sup>) como para petunia ( $2.36 \times 10^5$  protoplastos  $\times$  ml<sup>-1</sup>); esta concentración enzimática fue tomada del trabajo realizado por Werlemark (1999), el mismo que aisló protoplastos de rosa a partir de hojas *ex vitro* bajo la misma concentración enzimática.

Con T<sub>1</sub> (Celulasa 0.8%, Macerozima y pectoliasa 0.05%) y T<sub>2</sub> (Celulasa 1%, Macerozima y pectoliasa 0.5), no se logró obtener una buena recuperación de protoplastos aislados debido a que estas concentraciones no permitieron que se produjera la digestión completa de la lámina media, que une las células entre si, ni de las paredes de la mayoría de las células; esto fue evidente al observar en el microscopio tejido con células intactas; al respecto

investigadores como Burger y Hackett (1982)<sup>47</sup> señalan que bajas concentraciones enzimáticas no liberan el suficiente número de protoplastos.

La recuperación de protoplastos aislados de rosa ( $2.41 \times 10^5$  protoplastos  $\times \text{ml}^{-1}$ ) y petunia ( $2.36 \times 10^5$  protoplastos  $\times \text{ml}^{-1}$ ), coinciden con el trabajo realizado por Werlermark (1999) quien trabajó con rosa y Taguchi (1993) con petunia, establecen que para lograr tener un buen rendimiento de los protoplastos se requiere que exista una recuperación de protoplastos aislados esta en un orden de  $2 \times 10^5$  protoplastos  $\times \text{ml}^{-1}$ . Sin embargo, Schum (2001) al trabajar con hojas de rosa *in vitro*, establece que para lograr tener un buen rendimiento de los protoplastos se requiere que exista una recuperación de protoplastos aislados de  $4 \times 10^6$ , lo que sugiere que uno de los aspectos mas importantes en el aislamiento de protoplastos, es la fuente de obtención.

Por otro lado, Werlermark trabajó con hojas de rosa y estableció un tiempo de incubación para el aislamiento de protoplastos de 19 horas, lo que a diferencia de los resultados obtenidos para esta investigación fue de 13 horas, ambas investigaciones fueron llevadas a cabo bajo las mismas condiciones, lo que indica que en la investigación se optimizó la recuperación de protoplastos aislados a partir de hojas de rosa.

En cuanto a los resultados obtenidos para el aislamiento de protoplastos de hojas de petunia, Taguchi (1993) logró aislar protoplastos en dos horas de exposición enzimática, a diferencia de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se obtuvo protoplastos aislados a las 12 horas de exposición enzimática, esta diferencia se debe a que las condiciones enzimáticas fueron diferentes, debido a que Taguchi (1993) empleó un coctel enzimático de Celulasa 1% y Driselasa 1%.

Los protoplastos fusionados por acción del PEG, se los cultivó en MS más complejo vitamínico y MS enriquecido con V220, ambos medios de cultivo resultaron adecuados para el desarrollo de callos debido a que se logró obtener callos de cultivo en un tiempo de 30 días, estos resultados fueron comparados con el trabajo realizado por Werlermark (1999), el mismo que establece que el tiempo óptimo de obtención de callos debe estar dentro de un tiempo no mayor a tres meses y Taguchi (1993) quien trabajó con protoplastos de petunia, el tiempo de obtención de callos debe estar sobre un tiempo límite de un mes a un mes y medio.

El medio de cultivo MS, fue tomado como referencia del trabajo realizado por Taguchi (1993) para el cultivo de protoplastos de petunia, Sakamoto (2000) y Schum (2001) quienes trabajaron con protoplastos de rosa, establecieron condiciones de crecimiento en base a los componentes del medio MS y los suplementos que se le incorporaron, debido a estos resultados se

logró establecer el medio de cultivo para que los protoplastos fusionados de rosa y petunia crezcan dentro del tiempo establecido por los autores antes mencionados.

## CONCLUSIONES

El grado de compatibilidad fue de 74.78% de fusión de protoplastos entre rosa y petunia, lo que demuestra que las barreras de incompatibilidad se eliminan totalmente y es posible fusionar material genético emparentado y no emparentado.

El T<sub>3</sub> a base de Celulasa 2.5%, Macerozima y Pectoliasa 0.5%, fue el más adecuado para digerir la pared celular y obtener protoplastos viables, permitiendo mejor eficiencia y mayor rendimiento en la obtención de protoplastos a partir de mesófilo hojas ya que se obtuvieron  $2.36 \times 10^5$  protoplastos x ml<sup>-1</sup> para petunia y  $2.41 \times 10^5$  protoplastos x ml<sup>-1</sup> para rosa.

El MS más complejo vitamínico y MS enriquecido con V220 resultaron adecuados para la diferenciación de protoplastos en callos, con temperatura constante de 24°C y por un tiempo de 30 días.

El número cromosómico para la petunia fue de  $2n = 18$  cromosomas, y el de rosa  $2n = 22$  cromosomas.

## RECOMENDACIONES

Debido a que la hibridación interespecífica no tiene barreras de incompatibilidad celular, se recomienda emplear la técnica de fusión de protoplastos para lograr obtener híbridos de especies filogenéticamente distanciadas.

Se recomienda utilizar material vegetal *in vitro* para obtener una mayor cantidad de protoplastos ya que este material es herbáceo y de él se puede aislar con mayor eficiencia las células vegetales.

Las plantas desarrolladas en invernadero deben ser jóvenes, pues en esta etapa de crecimiento del tejido es mucho más fácil una liberación y recuperación de protoplastos.

Desinfectar las hojas en una solución de jabón líquido ( 20 gotas x l<sup>-1</sup>), luego en una solución de Yodo, posteriormente en una solución de benlate y Bankit Co., y lavar las hojas con agua destilada esteril (ADE) y finalmente una desinfección con NaOCl al 2%.

Es conveniente controlar el potencial isoosmótico del medio de aislamiento, pues esto evitará que las células se encuentren en un medio hiper o hipotónico, el mismo que dañará por completo el material vegetal.

Para el aislamiento de protoplastos de petunia, se recomienda utilizar una concentración enzimática de Celulasa 1% + Driselasa 1%, debido a que este coctel enzimático optimiza el tiempo de recuperación de protoplastos aislados a partir de hojas.

Se recomienda utilizar MS V220 para abaratar costos y obtener resultados similares a los de MS enriquecidos con vitaminas.

## BIBLIOGRAFIA

<sup>1</sup>BRUMMER, E. C. 1999. Capturing heterosis in forage crop cultivar development. *Crop Sci*, 39:943-954.

<sup>2</sup>MATSUMOTO, K. 2001. Híbridos somáticos. *Biotecnología Ciencia & Desarrollo*, 20, mayo / junio: pp. 26-28.

<sup>3</sup>ALBRECHT, K.A.; WEDIN, W.F.; BUXTON, D.R. 1987. Cell-wall composition and digestibility of alfalfa stems and leaves. *Crop. Sci.*, 27: 735-741.

<sup>4</sup>Fusión de Protoplastos; Centro de investigaciones – PUCP; ; “Técnicas que abren campos de exportación”; <http://www.pucpr.edu.pe/invest/conciencia/numero3/index.htm>, San Diego-Argentina; actualizado a Julio 2005.

<sup>5</sup>Fusión de protoplastos, una nueva salida a la Agricultura, Centro de investigaciones de EDPA; “Fusión de protoplastos, con intervención del ADN”; [http://www.redpav-ftpolar.info.ve/agrotrop/v34\\_1-3/v343a014.html](http://www.redpav-ftpolar.info.ve/agrotrop/v34_1-3/v343a014.html); Madrid. España, 2005.

<sup>6</sup> Hibridación somática. Se encuentra limitada a especies que tengan buena capacidad de regeneración a partir de protoplastos. <http://www.argenbio.org/h/biblioteca/pdf/pasturasredbio.pdf+%2Bhibridaci%C3%B3n+%2Bsom%C3%A1tica&hl=es&gl=ec&ct=clnk&cd=2>

<sup>7</sup>AKASHI, R.; ADACHI. T. 1992. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured immature inflorescences of apomictic dallisgrass (*Paspalum dilatatum* Poir.). *Plant Sci.*, 82: 219-225.

<sup>8</sup>LINDSEY Y JONES, 1992. Biología celular de la ingeniería genética. En: *Biotecnología vegetal agrícola*, Capítulo 6. Editorial ACRIBIA, S.A., Zaragoza. pp.105-142.

<sup>9</sup>FIECHTER, A; “In Biochemical Engineering” ; *Plant Cell Culture II*; Diciembre 1ro 2003; P. 463-469., Vol. 18 Board. U.S.A.

<sup>10</sup>Aplicaciones de la Biotecnología Moderna, Universidad de Costa Rica, CIA – UCR; “Técnicas de Hibridación – Actualidad” [http://www.biotech.bioetica.org/clase2-4.htm#\\_Toc525640463](http://www.biotech.bioetica.org/clase2-4.htm#_Toc525640463); San José, Costa Rica, Julio 2004.

<sup>11</sup>Senda, M., J. Takeda, S. Abe and T. Nakamura. Induction of cell fusion of plant protoplasts by electrical stimulation. *Plant Cell Physiology* 20: 1441-1443 (1979).

<sup>12</sup>SMITH Robertha H.; “Techniques and Experiments”; *PLANT TISSUE CULTURE*; San Diego 1992; p.123-133; Segunda Edición; Academic Press.

<sup>13</sup>ALBERTS, B, OTROS. *Biología Molecular de la célula*. Omega – Barcelona. p 1181 – 1289

<sup>14</sup>YPS Bajai; "Plant Protoplast and Genetic Engineering"; BIOTECHNOLOGY IN AGRICULTURE AND FORESTRY 8; Germany 1989, p.170-171; Vol. 1; Springer – Verlag.

<sup>15</sup>ENDRESS, R. Plant cell Biotechnology. Springer – Verlag, Berlín. New York 1994. p 20 -25

<sup>16</sup>CARDENAS, Carlos. "Módulo de Fisiología Vegetal". Técnicas de hibridación. Sangolquí, 2002. Período Abril – Agosto.

<sup>17</sup>CONTRERAS, R. "Retrocruzamiento en vegetales de exportación". Importancia y utilización. Revista Fonaiap, Venezuela, p 21-22.

<sup>18</sup> Echenique, V. "Presente y futuro de la biotecnología en especies forrajeras en sudamérica, especialmente en Argentina". Depto. de Agronomía, Universidad Nacional del Sur. San Andrés 800 – 8000 Bahía Blanca, Argentina.

<sup>19</sup> Centro de investigaciones científicas de de Argentina, " Técnicas de hibridación de material vegetal a novel ornamental", <http://72.14.203.104/search?q=cache:9cZ1XTjk6y8J:www.argenbio.org/h/biblioteca/pdf/pasturasredbio.pdf+%2Bhibridaci%C3%B3n+%2Bsom%C3%A1tica&hl=es&gl=ec&ct=clnk&cd=2>

<sup>20</sup>BHOJWANI, S.S.; RAZDAN, M.K. 1996. Protoplast isolation and culture. Somatic hybridization and cybridization. En: Plant Tissue Culture: Theory and Practice, Capítulos 12 y 13. S.S. Bhojwani y M.K. Razdan (eds.) Elsevier, Amsterdam. pag. 337-406.

<sup>21</sup>LINDSEY Y JONES, 1992. Biología celular de la ingeniería genética. En: Biotecnología vegetal agrícola, Capítulo 6. Editorial ACRIBIA, S.A., Zaragoza. pág.105-142.

<sup>22</sup>MATSUMOTO, K. 2001. Híbridos somáticos. Biotecnología Ciencia & Desarrollo, 20, mayo / junio: pag. 26-28.

<sup>23</sup>ZIMMERMANN, U. 1983. Electrofusion of cells: principles and industrial potential. Trends in Biotechnology, 1,5: pag. 149-156.

<sup>24</sup>ABDULLAH, A.; PEDERSEN, S.; ANDERSEN, S.B. 1994. Triploid and hexaploid regenerants from ornamental plants, via anther culture. Plant Breed., 112: 342–345.

<sup>25</sup> NCBI, entrez, “ Biología molecular y celular de plantas ornamentales” Rosas, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Search&db=books&doptcmdl=GenBookHL&term=fusion+protoplast+in+plants+AND+101118%5Buid%5D&rid=iga.figgrp.3077>

<sup>26</sup> NCBI, entrez, “ Biología molecular y celular de p. ornamentales” petunia, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Search&db=books&doptcmdl=GenBookHL&term=fusion+protoplast+in+plants+AND+176682%5Buid%5D&rid=eurekah.section.4691#4694>

<sup>27</sup> Aplicación de la Biotecnología moderna, “Aplicación de técnicas de cultivo *in vitro*”.<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Search&db=books&doptcmdl=GenBookHL&term=fusion+protoplast+in+plants+AND+176380%5Buid%5D&rid=eurekah.section.42776>

<sup>28</sup>CAMADRO, E.L. & MENDIBURU, A.O., 1988, "Utilización de germoplasma en el mejoramiento de la papa", *Revista Latinoamericana de la Papa*, 1:35-43.

<sup>29</sup>HAWKES, J.C., 1990, *The potato: Evolution, Biodiversity and Genetic Resources*, Belhaven Press, London, & Smithsonian Institute Press, Wasnington.

<sup>30</sup>ROSS, H., 1986, *Potato Breeding. Problems and Perspectives. Advances in Plant Breeding*, Verlag Paul Parey, Berlin/Hamburg.

<sup>31</sup> Centro de Investigaciones – España, “Compatibilidad celular y sexual en especies vegetales y especies superiores, España.  
<http://www.um.es/investigacion/impresos/liberacion.pdf#search=%22%2Bcompatibilidad%20%2Bsexual%20%2Bvegetales%22>

<sup>32</sup> –Centro de Investigaciones en Granos y Semillas – CIGRAS, “Fusión de protoplastos de variedades de rosa a nivel de germoplasma almacenado”  
[.www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0034-7744200](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0034-7744200).

<sup>33</sup> CONACYT, “Impacto en la alimentación de especies modificadas genéticamente”.<http://www.conacyt.gob.sv/020315RAImpactoalimGMnutrichumana.ppt>

<sup>34</sup> Universidad de Costa Rica, “Alimentos transgénicos, ventajas y desventajas”.<http://www.vinv.ucr.ac.cr/girasol/documgirasol/Alimentostransgenicos.rtf>

<sup>35</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Centro América, “Análisis de especies frutales fusionadas mediante marcadores moleculares”.  
<http://www.who.int/fsf/GMfood/>

<sup>36</sup>Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal, Facultad de Farmacia, Universitat de Valencia (Avda. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100-Burjassot, Valencia;Teléfono: 96-3544959 ;e-mail: daniel.ramon@uv.es)

<sup>37</sup>Departamento de Biotecnología, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimento-CSIC (Apartado Postal 73, Burjassot, 46100-Valencia; Teléfono: 96-3900022; Fax: 96-3864954)

<sup>38</sup> Instituto Nacional de investigaciones Agrarias, “Compatibilidad celular entre especies ornamentales y leñosas de la región”

<http://alerce.inia.cl/sochifit/PDF/VI.pdf#search=%22%2Bcompatibilidad%20%2Bsexual%20%2Bespecies%20%2Bvegetales%22>.

<sup>39</sup> Revista Ciencia Hoy, “Publicaciones de tecnología aplicadas a la Biotecnología Moderna”, <http://www.cienciahoy.org.ar/hoy35/papa05.htm>

<sup>40</sup> Arcioni S. & Pupilli F., Enciclopedia of Applied plant Science. Vol. 3, Thomas B., Murphy D & D. Murray, Ed. ( Elsevier Academic, UK, 2003), Somatic Hybridization pp.

<sup>41</sup> Daniel Ramón. *Los genes que comemos*. Algar, 1999, Alzira.

<sup>42</sup> Jared Diamond. “Evolution, consequences and future of plant and animal domestication”. *Nature* 418, 2002, págs 700-707.

<sup>43</sup> Moshe Feldman, Ernest Sears. “Los recursos genéticos del trigo silvestre” *Investigación y Ciencia*, Marzo 1981, págs 50-61.

<sup>44</sup> Daniel Ramón, María Dolores Calvo. “Debate en torno a la comercialización de los alimentos transgénicos”. *Arbor* 661 2001, págs 171-186.

<sup>45</sup> Graham Brookes. “The farm level impact of using Bt maize in Spain”. *Crop Biotechnology Science* 3, 2003, 1-16.

<sup>46</sup> Marcel Prins. "Broad virus resistance in transgenic plants". Trends in Biotechnology 21, 2003, págs 373-375.

<sup>47</sup> Dilip Shah, Robert Horsch, Harry Klee, Ganesh Kishore, Jill Winter, Nilgun Tumer, Cathy Hironajka, Patricia Sanders, Charles Gasser, Serdar Aykent, Ned Siegel, Stephen Rogers, Robert Fraley. "Engineering herbicide tolerance in transgenic plants". Science 233, 1986, págs 478-481.

<sup>48</sup> Ciencia Exacta, " Simetría entre células somáticas extraídas de plantas ornamentales". <http://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2005/mar-abr/art-6.pdf>

<sup>49</sup> Centro Agrario de Investigaciones – España, "En búsqueda de un nuevo regimen biotecnológico para la nueva era de producción", <http://www.um.es/investigacion/impresos/liberacion.pdf#search=%22%2Bcompatibilidad%20%2Bsexual%20%2Bvegetales%22>

<sup>50</sup> Izquierdo, J. and Roca, W. 1998. Underutilized Andean food crops: status and prospects of plant biotechnology for the conservation and sustainable agricultural use of genetic resources. Acta Horticulturae 457:157-172.

<sup>51</sup> Komari, T. 1990. Transformation of cultural cells of *Chenopodium quinoa* by binary vectors carrying a fragment of DNA from the virulent region of pTiBo 542. Plant Cell Reports 9: 303-306.

<sup>52</sup> Primer encuentro latinoamericano de Biotecnología, “Compartiendo tecnología moderna, entre países hermanos”.  
[http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc\\_2001/talleres/Wk6/Angel%20Mujica/andinosart3.PDF](http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc_2001/talleres/Wk6/Angel%20Mujica/andinosart3.PDF)

<sup>53</sup>Kone, J., Falconi, C. y Hernandez, H. (eds.). 1997. Transformación de las prioridades en programas viables. En: Actas del seminario de política biotecnológica agrícola en América Latina.

<sup>54</sup>ISNAR/Intermediary Biotechnology Service/Cambio Tecnológico “ The Hague”. México. 202 p.

Lentini, Z., Martínez, C., Roca, W. 1997. Cultivos de anteras de arroz en el desarrollo de germoplasma. CIAT, Cali, Colombia; 57 p.

<sup>55</sup> Archivo de Investigaciones de floricultura, “Fusión de protoplastos a nivel *in vitro* para Solanaceas”. <http://www.fiagro.org.sv/archivos/0/379.pdf>

<sup>56</sup> ARIAS, Albertos, Tesis doctoral, “Obtención de híbridos somáticos en kiwi serrano y kiwi andino”.[http://www.tdr.cesca.es/TESIS\\_UM/AVAILABLE/TDR-12210530258/cpetri1de1.pdf](http://www.tdr.cesca.es/TESIS_UM/AVAILABLE/TDR-12210530258/cpetri1de1.pdf)

<sup>57</sup> Schum A., Hofmann K., Ghalib N. & Twafik A. “ Factors affecting protoplast isolation and plant regeneration in *Rosa* spp., Gartenbauwisswnschaft, 66 (3) pp. 115 – 122 (2001).

<sup>58</sup>Glowka, Lyle, "A guide to designing legal frameworks to determine access to genetic resources", *Environmental Policy and Law Paper*, No 34, IUCN, 1998.

<sup>59</sup>ICSTD, BRIDGES: "Between Trade and Sustainable Development", No. 9, November-december, 2000.

<sup>60</sup>Krattiger, Anatole, "Food Biotechnology: promising havoc or hope for the poor", *Proteus: a Journal of Ideas*, 17, 3-8, Shippensburg University, 2000.

<sup>61</sup>TRIGIANO, Robert, "Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises", Second Edition, Boca Raton - London . New York 2000.

<sup>62</sup>Taguchi,T., Sakamoto K., Tereda M.. "Feritile somatic hybrids between *Petunia hybrida* and a wild species, *Petunia variabilis*." . *Theoretical and Applied Genetics*. September 24, 1992.

<sup>63</sup>RIVERA, Ricardo. "Aislamiento y Cultivo de Protoplastos en maracuyá". *Isolation and Cultive of Protoplast in Passion Fruit. Acta Biológica Colombia*, Volumen 9 No. 2, 2004.

<sup>64</sup>Guía de Investigación CIP 10, "Técnicas Citológicas para determinar el número cromosómico y la fertilidad de las papas".

<sup>65</sup>SAITO, Hiroyuki. "Preparation of Microprotoplasts for Partial Genome Transfer via Microplast Fusion in Liliaceous Ornamental Plants", *Japan Agricultural research Quartely JARQ*. Vol. 36, No. 3. 2002

**A N E X O S**

**Anexo 1.** Composición de medio de cultivo Murashige & Skoog 1962 para cultivo de protoplastos de Rosa sp., y Petunia nictaginiflora.

<b>Composición de Macro nutrientes</b>	
KNO <sub>3</sub>	1990 mg/l
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1250 mg/l
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	440 mg/l
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	370 mg/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170 mg/l
<b>Composición de Micro nutrientes</b>	
MnSO <sub>4</sub> *4H <sub>2</sub> O	22306 µg/l
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	8627 µg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6184 µg/l
KI	880.1 µg/l
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	27.97 µg/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	291.9 µg/l
Na <sub>2</sub> EDTA*2H <sub>2</sub> O	7225 µg/l
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	7803 µg/l
<b>Composición de Vitaminas</b>	
Inositol	59.1 mg
Tiamina HCl	301.2 µl /l
Ácido Nicotínico	472.4 µl /l
Piridoxina HCl	584.1 µl /l

**Anexo 2.** Composición del medio Murashige & Skoog V220 - gpara cultivo de protoplastos obtenidos de Rosa sp., y Petunia nictaginiflora

<b>Composición de Macro nutrientes</b>	
KNO <sub>3</sub>	30 mg/l
NaNO <sub>3</sub>	1100 mg/l
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	200 mg/l
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	760 mg/l
KCl	1020 mg/l
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	300 mg/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	60 mg/l
<b>Composición de Micro nutrientes</b>	
MnSO <sub>4</sub> *4H <sub>2</sub> O	1060 µg/l
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	200 µg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	200 µg/l
KI	30 µg/l
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	20 µg/l
H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	400 µg/l
CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	80 µg/l
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	8900 µg/l
<b>Composición de Vitaminas</b>	
V220 - G	500 µl /l

**Anexo 3.** Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III) para datos recolectados para *Petunia nictaginiflora*.

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
<b>Modelo</b>	1,00E+23	53	18906050198.00	584.64	<0.0001
<b>ENZIMAS</b>	528374929012.00	2	264187464506.00	8169.58	<0.0001
<b>Tiempo</b>	320887549383.00	17	18875738199.00	583.70	<0.0001
<b>ENZIMAS*Tiempo</b>	152758182099.00	34	4492887708.79	138.94	<0.0001
<b>Error</b>	3492500000.00	108	32337962.96		
<b>Total</b>	1,01E+23	161			

**Anexo 4.** Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III) para datos recolectados para *Rosa* sp.

<b>F.V.</b>	<b>SC</b>	<b>gl</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>p-valor</b>
<b>Modelo</b>	929284234568.00	53	17533664803.20	354.86	<0.0001
<b>ENZIMA</b>	561973049383.00	2	280986524691.00	5686.78	<0.0001
<b>Tiempo</b>	241946401235.00	17	14232141249.10	288.04	<0.0001
<b>ENZIMA*Tiempo</b>	125364783951.00	34	3687199527.96	74.62	<0.0001
<b>Error</b>	5336333333.33	108	49410493.83		
<b>Total</b>	934620567901.00	161			

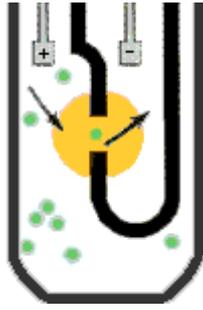
## **Anexo 5**

### **TÉCNICAS DE CONTAJE CELULAR**

Una suspensión celular se caracteriza por presentar un número de partículas microscópicas dispersas en un fluido. Habitualmente será necesario determinar tanto la densidad de las células en la suspensión como el porcentaje de éstas que son viables.

Para determinar la densidad de las células se emplean diferentes técnicas, desde la relativamente simple cámara de conteo celular de la que existen numerosas variantes, entre ellas la que empleamos (cámara de Neubauer), hasta equipos automáticos de conteo celular como el "Cell Coulter" de la empresa Beckman-Coulter.

El principio del contador celular se basa en la medida de los cambios en la resistencia eléctrica que se producen cuando una partícula no conductora en suspensión en un electrolito atraviesa un pequeño orificio. Como se puede ver en el esquema, una pequeña abertura entre los electrodos es la zona sensible a través de la que pasan las partículas que se encuentran en suspensión. Cuando una partícula atraviesa el orificio desplaza su propio volumen de electrolito. El volumen desplazado es medido como un pulso de voltaje. La altura de cada pulso es proporcional al volumen de la partícula. controlando la cantidad de la suspensión que circula a través del orificio es posible contar y medir el tamaño de las partículas. Es posible contar y medir varios miles de partículas por segundo, independientemente de su forma, color y densidad.

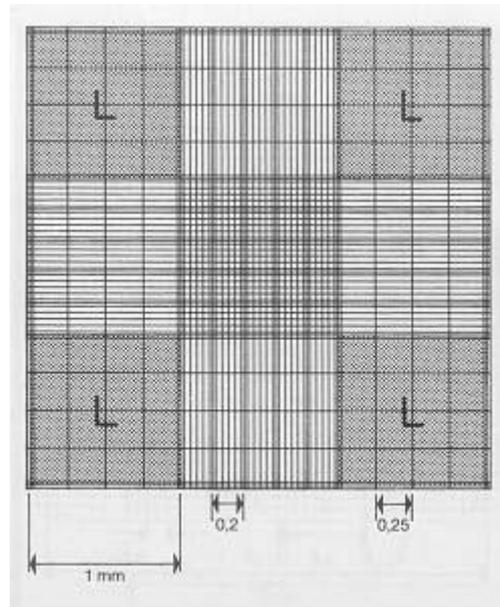


En la unidad de Citometría de flujo y Microscopia Confocal de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona se dispone de contadores celulares.

Sin embargo, es posible determinar la densidad celular empleando métodos más sencillos. Nos basta con una cámara de contaje celular, por ej. la cámara de Neubauer, y un microscopio. Una cámara de contaje celular es un dispositivo en el que se coloca una muestra de la suspensión a medir. El dispositivo presenta unas señales que determinan un volumen conocido (x microlitros). Al contar bajo el microscopio el número de partículas presentes en ese volumen se puede determinar la densidad de partículas en la suspensión de origen.

La cámara de Neubauer es una cámara de contaje adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cual se ha marcado con la ayuda de un diamante una cuadrícula como la que se ve en la imagen. Es un cuadrado de 3 x 3 mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0.25 mm. Así pues el área sombreada y marcada L corresponde a 1 milímetro cuadrado. La depresión central del cubreobjetos está hundida 0.1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando se cubre con un cubreobjetos éste dista de la

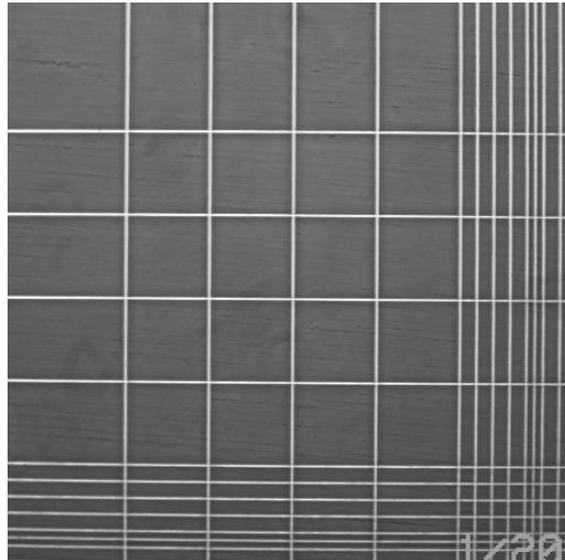
superficie marcada 0.1 milímetro, y el volumen comprendido entre la superficie L y el cubreobjetos es de 0.1 milímetro cúbico, es decir 0.1 microlitro.



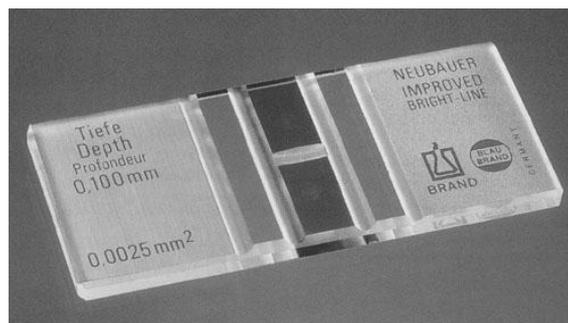
Si contamos las cuatro áreas sombreada (L) observando un total de x células entre las cuatro áreas, la concentración en la suspensión celular será :

$$\text{concentración en la suspensión (células / mL)} = 10000 (x/4)$$

En la imagen puedes observar el aspecto de una de las regiones marcadas como L y que en el microscopio se ven como una cuadrícula de 16 pequeños cuadrados de 0.25 milímetros de lado. Esta imagen ha sido tomada empleando un microscopio invertido de contraste de fases.



Existen numerosos modelos de cámaras de conteo celular adaptadas a su uso en microscopía. En la imagen puedes observar una cámara de Neubauer doble, como las que usas en el laboratorio de prácticas. Para determinar la viabilidad celular se emplean diferentes métodos. El más común es el de tinción con azul tripán. El azul tripán es un coloide que se introduce en el interior de las células que presentan roturas en la membrana. Así pues las células que aparecen en la imagen, claramente de color azul, son consideradas no viables. Asimilar células blancas, por exclusión, a células viables es un error pues por este método se sobrevalora la viabilidad de las células en la suspensión, determinando como inviables sólo aquellas con la membrana rota. Existen otros métodos de determinación de la viabilidad celular como el más preciso de la tinción con yoduro de propidio.



## Anexo 6

### CONTENIDO NUTRICIONAL E INGREDIENTES DE V220 – G



**INGREDIENTES:** Agua carbonatada, azúcar, dextrosa, ácido cítrico, citrato de sodio, taurina, cafeína, riboflavina (vitamina B2), nicotinamida (vitamina B3), ácido pantoténico (vitamina B5), piridoxina HCl (vitamina B6), cobalamina (vitamina B12), sabor energy drink, color caramelo.  
**CONTIENE TAURINA Y CAFEÍNA.**

**220V BEBIDA TONIFICANTE:** Estimula el metabolismo • Mejora la concentración • Aumenta el estado de alerta y la sensación de bienestar.  
**ATENCIÓN:** No se recomienda para diabéticos, menores de edad, mujeres embarazadas; personas sensibles a la cafeína, de edad avanzada, con enfermedades cardiovasculares y gastrointestinales.  
**RECOMENDACIONES DE USO:** No consumir con bebidas alcohólicas; antes, durante y después de un esfuerzo físico.

**HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS**

**ELABORADO POR**

**ADRIANA GIOCONDA DE LA TORRE RODRÍGUEZ**

.....

**COORDINADORA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA  
INGENIERIA EN BIOTECNOLOGÍA**

.....  
**SEÑORA MSC. MONICA JADÁN G.**

.....  
**SECRETARIO ACADÉMICO  
AB. VINICIO ZABALA**

**Sangolquí, 19 de Enero, 2007**