



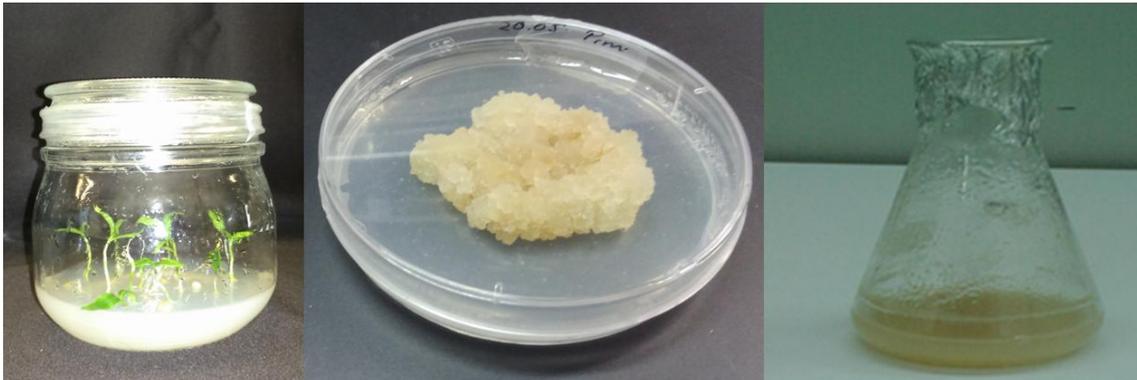
UNIVERSIDADE DA CORUÑA

## TRABAJO DE FIN DE GRADO

**Diseño experimental para la obtención de suspensiones celulares de *Capsicum annuum* L. var. *annuum***

**Experimental design for the obtaining of cellular suspensions of *Capsicum annuum* L. var. *annuum***

**Deseño experimental para a obtención de suspensións celulares de *Capsicum annuum* L. var. *annuum***



Vanesa Codesal García

Julio de 2016

Directora del trabajo: Dr. María de los Ángeles Bernal Pita da Veiga



# ÍNDICE

ABSTRACT.....	1
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	2
1.1. <i>Capsicum annuum</i> L.....	2
1.2. Cultivo <i>in vitro</i> .....	4
1.3. Callos .....	5
1.4. Suspensiones celulares .....	6
2. OBJETIVOS.....	7
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	8
3.1. Material vegetal.....	8
3.2. Reactivos .....	8
3.3. Preparación de medios.....	8
3.3. Esterilización material vegetal .....	8
3.4. Inicio de vitro plant.....	8
3.4. Inducción de callo y repicado.....	9
3.5. Inducción de suspensiones celulares y repicado.....	9
3.6. Estudio del crecimiento y viabilidad de las suspensiones.....	9
3.6.1. Empaquetamiento celular (PCV) .....	9
3.6.2. Conductividad.....	10
3.6.3. pH.....	10
3.7. Estudio de peroxidasas y fenoles.....	10
3.7.1. Medición actividad peroxidasa .....	10
3.7.2. Medición fenoles .....	11
4. RESULTADOS y DISCUSIÓN.....	12
4.1. Obtención de <i>in vitro</i> plant .....	12
4.2. Obtención de callos y repicado.....	13
4.3. Obtención de suspensiones celulares .....	14
4.4. Análisis de las suspensiones celulares.....	15
4.4.1. Empaquetamiento celular (PVC), conductividad y pH.....	15
4.4.2. Actividad peroxidasa.....	17
4.4.3. Fenoles .....	17
6. CONCLUSIONS.....	19
6. CONCLUSIONES .....	19
7. BIBLIOGRAFÍA.....	20

## ABSTRACT

Pepper (*Capsicum annuum* L.) is a plant of great commercial interest, and this is the reason for the great number of studies carried out regarding *in vitro* culture of this species. In this study an experimental design to obtain cell suspensions is proposed. Starting from explants of plants of pepper obtained *in vitro*, the callus formation was induced in solid medium supplemented with kinetin and 2,4-D. Cell suspensions were initiated from these friable calli, and viability and cellular growth (cell packing, pH and conductivity) were measured, as well as peroxidase enzyme and phenolic compounds. The results obtained showed that the cell suspensions of *Capsicum annuum* L. are of good quality and viable, therefore the experimental design is suitable.

## RESUMEN

El pimiento (*Capsicum annuum* L.) es una planta de gran interés comercial, razón por la cual han sido numerosos los trabajos sobre cultivos *in vitro* de esta especie. En este estudio se propone un diseño experimental para la obtención de suspensiones celulares. A partir de explantos de plantas de pimiento obtenidas *in vitro*, se induce la formación de callo en medios sólidos suplementados con kinetina y 2,4-D. Con estos callos friables se inician suspensiones celulares sobre las que se realizaron medidas de viabilidad y crecimiento celular (empaquetamiento celular, pH y conductividad) y de enzima peroxidasa y de compuestos fenólicos. Los resultados obtenidos mostraron que las suspensiones celulares de *Capsicum annuum* L. son de buena calidad y viables, por lo que el diseño experimental es adecuado.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. *Capsicum annuum* L.

El pimiento (*Capsicum annuum* L.) es una planta hortícola de origen americano, cultivada en Europa desde el primer viaje de Cristóbal Colón a América (Estrada *et al.*, 2000). Pertenece a la familia de las Solanáceas, la cual incluye a especies como la patata, el tomate o el tabaco. Dentro del género *Capsicum*, se engloban cinco especies diferentes, *C. furtescens*, *C. chinense*, *C. baccatum*, *C. pubescens* y *C. annuum* (Bodhipadma, 2002).

El origen del género *Capsicum* tiene lugar en áreas geográficamente diferenciadas en América, que fue sufriendo un proceso de domesticación en esas zonas, causando la modificación del vegetal, con el fin del aprovechamiento de sus frutos. En concreto la especie *C. annuum* L, que es la especie más frecuente en Europa, tuvo lugar su proceso de domesticación en México (Estrada *et al.*, 2000) (Fig. 1).

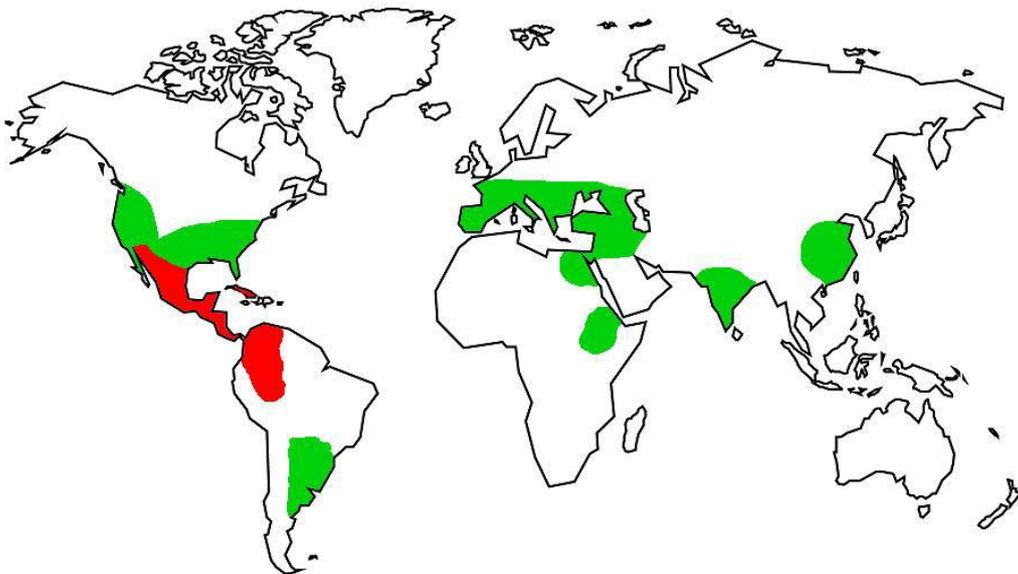


Fig. 1. Distribución de *Capsicum annuum* L. En rojo se localiza la zona de origen de la especie y en verde la zona de cultivo de la misma. Tomado de: [https://s10.lite.msu.edu/res/msu/botonl/b\\_online/schaugarten/Capsicumannuum/Sweet\\_Pepp.html](https://s10.lite.msu.edu/res/msu/botonl/b_online/schaugarten/Capsicumannuum/Sweet_Pepp.html)

*Capsicum annuum* L. (Fig. 2) es una planta anual de unos 150 cm de altura, con un tallo simple con 8-15 hojas generalmente perennes. El modo de crecimiento es desde el ápice con la formación de dos cotiledones, que cada uno de los cuales dará lugar a dos hojas, y se dividirán secundariamente en otras dos ramas. De estas dos ramas divididas dicotómicamente, una de ellas normalmente es suprimida, por lo que la planta crece como un simpodio (Bodhipadma, 2002). Esta especie representa el quinto cultivo hortícola en cuanto a superficie cultivada y el octavo en cuanto a producción total (Bernal *et al.*, 2012).



**Fig. 2. Planta de pimiento (*Capsicum annuum* L.)**

## 1.2. Cultivo *in vitro*

La técnica de cultivo *in vitro* es utilizada para producir plántulas. Consiste básicamente en el cultivo de pequeños fragmentos de tejidos y órganos en condiciones asépticas empleando un medio de cultivo determinado y bajo unas condiciones ambientales controladas (Kumar and Reddy, 2011), las cuales permiten un ambiente apropiado para el crecimiento y multiplicación celular de los vegetales. Estas condiciones incluyen un suplemento de nutrientes, un pH determinado, temperatura adecuada y atmósfera apropiada (Hussain *et al.*, 2012).

Los objetivos que se intentan conseguir con la utilización de estas técnicas son numerosos y diferentes: estudios básicos de fisiología, genética y bioquímica, bioconservación y producción de compuestos útiles, incremento de la variabilidad genética, obtención de plantas libres de patógeno, propagación de plantas y conservación e intercambio de germoplasma (Mroginski and Roca, 1991).

El proceso para la obtención de plantas a partir de cultivos *in vitro* está compuesto por varias fases (Kumar and Reddy, 2011) que pueden ser observados en la Fig. 3. Estas serían: a) selección y preparación de la planta; b) introducción en el medio de cultivo; c) multiplicación; d) enraizamiento *in vitro*; e) aclimatación *in vivo* y f) crecimiento y desarrollo de las plantas.

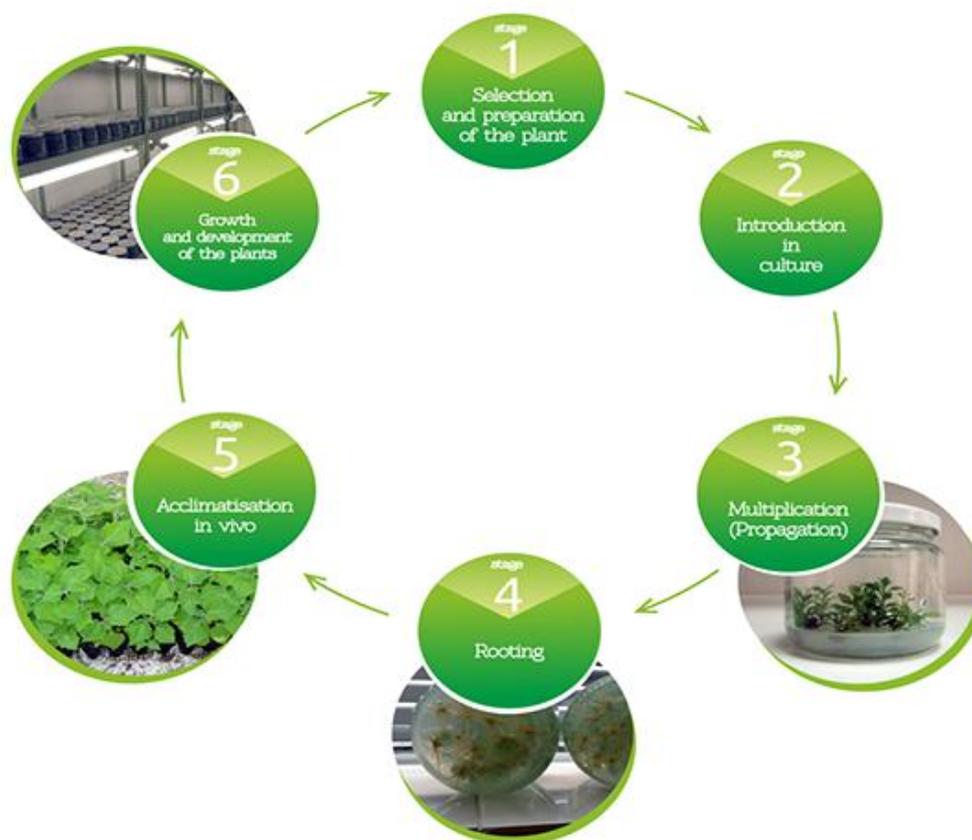


Fig. 3. Diagrama del proceso de cultivo *in vitro*. Tomado de: [http://paulowniatrees.eu/eng/wp-content/uploads/2012/09/Diagram\\_invitro.png](http://paulowniatrees.eu/eng/wp-content/uploads/2012/09/Diagram_invitro.png)

Las principales ventajas que tienen los cultivos *in vitro* frente a los cultivos convencionales están relacionados con la reducción de los costes e incremento de la productividad mediante el control automatizado del proceso, regulación de procesos metabólicos, selección de líneas celulares, inmovilización celular, obtención de metabolitos secundarios en condiciones controladas y el incremento del rendimiento de los mismos, elicitación y transformación genética (Pérez-Alonso and Jiménez, 2011).

Los primeros datos publicados acerca de la regeneración de plantas de pimiento a partir de tejidos vegetales datan del año 1978, siendo numerosos los estudios acerca de este tema (Orlinska and Nowaczyk, 2015).

### 1.3. Callos

Los callos son una masa de células individuales indiferenciadas totipotentes y que, por lo tanto, son capaces de regenerar una nueva planta entera. Para que la inducción a callo sea efectiva, hay que tener en cuenta tres factores fundamentales que son el recurso vegetal del que se parte (explanto), las características genéticas del individuo y la composición del medio de cultivo utilizado para la inducción (Van Eck and Kitto, 1990).

En lo que se refiere a la composición del medio, la inducción a callo es efectiva si al medio se le añaden fitohormonas como auxinas y citoquininas, principalmente (Benderradji *et al.*, 2012).

Dependiendo del tipo de regeneración que tengan los callos, existen diferentes modalidades (Fig. 4). Así podemos encontrar callos que permanecen indiferenciados hasta callos a partir de los cuales se puede regenerar hojas, embriones o raíces.

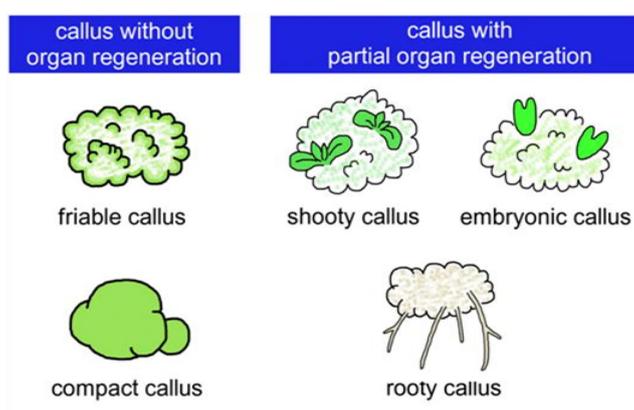


Fig. 4. Diferentes tipos de callos. Modificado de: Ikeuchi *et al.* (2013).

## 1.4. Suspensiones celulares

Uno de los métodos de cultivo celular son las suspensiones celulares, que consiste en un cultivo estéril con medio líquido iniciado bajo condiciones asépticas a partir de fragmentos de callos friables. Los callos, como ya se ha mencionado anteriormente, se inician a partir de fragmentos esterilizados de la planta, que se inducen en placas con medio sólido suplementado con hormonas (Mustafa *et al.*, 2011) (Fig. 5).

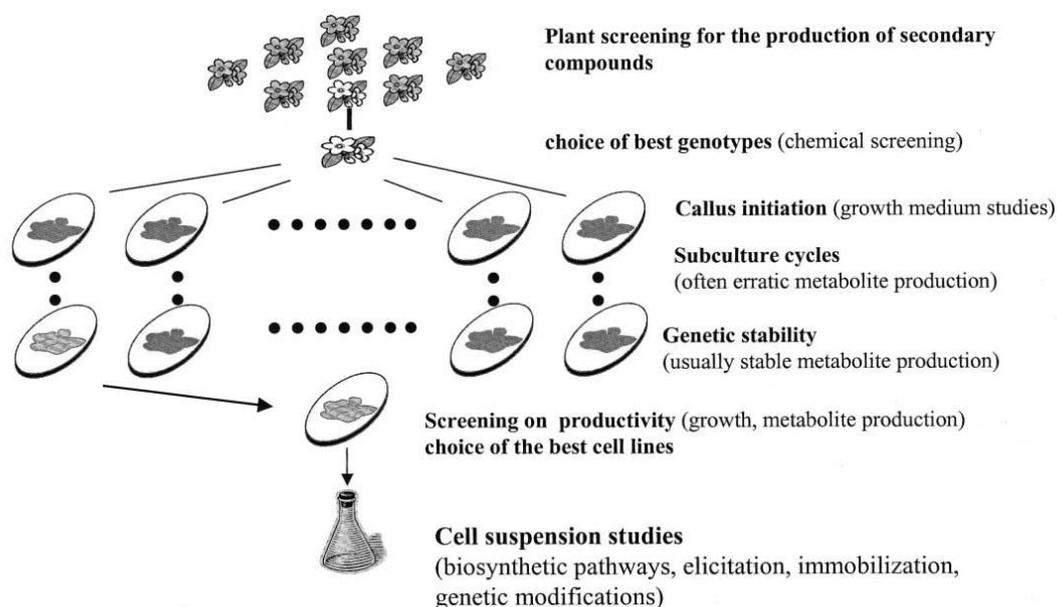


Fig. 5. Diagrama de obtención de suspensiones celulares. Tomado de: Bourgaud *et al.* (2001).

En investigaciones con vegetales, las suspensiones celulares han sido utilizadas para estudios sobre el ciclo celular, estudios fisiológicos y bioquímicos, formación de metabolitos secundarios y embriogénesis somática (Szabados *et al.*, 1991).

Hay que tener en cuenta, que previamente a realizar una suspensión celular hay que conseguir la estabilidad genética de la línea celular, para ello es necesario el escaneo de diferentes líneas de callos, eligiendo el más adecuado en función del medio de cultivo y la productividad (Bourgaud *et al.*, 2001).

Las principales ventajas de las suspensiones celulares están relacionadas con el rápido crecimiento celular, transformación genética, alta expresión de proteínas y bajo contenido en fenoles (Gupta and Ibaraki, 2006).

## 2. OBJETIVOS

Para poder establecer un diseño experimental para la obtención de suspensiones celulares de *Capsicum annuum* L. es preciso desarrollar los siguientes objetivos:

- 2.1 Obtención de *in vitro* plant a partir de semillas de pimiento
- 2.2. Obtención de callos y repicado de los mismos
- 2.3. Obtención de suspensiones celulares a partir de callos friables
- 2.4. Estudio del crecimiento y viabilidad de las suspensiones celulares
- 2.5. Determinación de la actividad peroxidasa y compuestos fenólicos.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Material vegetal

Las semillas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) han sido proporcionadas por el grupo FISAPLANT de Fisiología Vegetal de la Universidad de A Coruña.

#### 3.2. Reactivos

Los reactivos utilizados tanto para la preparación de medios como para las determinaciones espectrofotométricas fueron de la marca Sigma- Aldrich.

#### 3.3. Preparación de medios

Los compuestos y cantidades necesarias para la preparación de medio para inicio de *vitro* plant, inducción a callo e inducción a suspensiones celulares se muestran a continuación (Tabla. 1):

	Inicio <i>vitro</i> plant	Inducción callo	Inducción suspensiones
<b>Murashige y Skoog</b>	2,3 g	2,3 g	2,3 g
<b>Sacarosa</b>	15 g	15 g	15 g
<b>Caseína</b>	125 mg	125 mg	125 mg
<b>Vitaminas de Morel</b>	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
<b>Kinetina (100 mg/l)</b>	-	0,250 ml	0,250 ml
<b>2,4-D (2,4-Ácido diclorofenoxiacético) (3g/l)</b>	-	7,5 ml	7,5 ml
<b>Agar</b>	4 g	4g	-

Tabla 1. Compuestos y cantidades para la preparación de 500 ml medio.

Se añaden todas las cantidades de los compuestos anteriormente mencionados excepto el agar, a un vaso de precipitados de 500 ml que contiene 400 ml de agua destilada. Se coloca en el agitador y se ajusta el pH, hasta obtener un valor de 5,8. Se enrasa en volumen con agua destilada hasta los 500 ml. En el caso de que los medios lleven agar, este se añade después del enrasado y se autoclava.

#### 3.3. Esterilización material vegetal

Las semillas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) fueron desinfectadas con etanol al 70 % durante 2 minutos, y después se trataron con hipoclorito sódico al 20 % durante 20 minutos. Ambos procesos se realizan en un vaso de precipitados en un agitador. A continuación, las semillas son llevadas a la cámara de flujo laminar en donde se realizan tres lavados consecutivos con agua destilada estéril colocándose en un papel estéril para secar durante 30 minutos.

#### 3.4. Inicio de *vitro* plant

Una vez que las semillas están desinfectadas y secas, se colocan en los botes de cristal con tapa que contienen medio sólido sin hormonas. Se disponen en círculo, pero dejando espacio entre ellas. Se cierran los botes con parafilm y se colocan en la cámara de cultivo que se encuentra a 25°C con una intensidad lumínica constante,

para que al cabo de 8 días las semillas germinen y se obtenga la planta de pimiento (*Capsicum annuum* L.) *in vitro*.

### 3.4. Inducción de callo y repicado

Pasados diez días desde la germinación las semillas, se procede a la inducción de callo. Para ello, se eliminan las hojas viejas y raíces de la plántula, mientras que los tallos, hojas jóvenes y ápice se utilizan como explantes. Se realizan cortes de 0.5 cm de las partes mencionadas anteriormente en la cámara de flujo laminar y se transfieren asépticamente a placas Petri que contienen medio sólido suplementado con 2,4-D y kinetina. Las placas Petri se cierran con parafilm para prevenir la contaminación y se colocan en oscuridad en la cámara de cultivo que se encuentra a 25°C durante 2-3 semanas para la obtención de callo.

Una vez que se produce la inducción del callo, se procede a su repicado en la cámara de flujo laminar. Con un bisturí se separan los callos formados del explante y se cogen con unas pinzas para pasarlos a una placa Petri con medio sólido suplementado con 2,4-D y kinetina. Los callos se colocan en el centro de la placa. Una vez finalizado este proceso, se cierran las placas con parafilm para evitar contaminación y se ponen en oscuridad de nuevo en la cámara de cultivo para que continúe el crecimiento.

### 3.5. Inducción de suspensiones celulares y repicado

Después de 3 semanas del repicado de los callos, se va a proceder a la inducción de suspensiones celulares. Para ello, en la cámara de flujo laminar, se pesan 8 gramos de callo friable en un erlenmeyer estéril de 100 ml y se añaden 40 ml de medio líquido suplementado con 2,4-D y kinetina. Se tapa con papel de aluminio y se colocan en un agitador orbital, manteniéndose en agitación continua en la cámara de cultivo.

Para repicar las suspensiones, se añade la misma cantidad de medio líquido en el mismo erlenmeyer (40 ml) se agita con la mano y se reparte en dos erlenmeyer. El repicado de las suspensiones se realiza cada 15 días.

### 3.6. Estudio del crecimiento y viabilidad de las suspensiones

Para evaluar el empaquetamiento celular (PCV), pH y conductividad se han tomado muestras a 1, 2, 4 y 7 días.

#### 3.6.1. Empaquetamiento celular (PCV)

El empaquetamiento celular mide la cantidad de células existentes en un volumen de muestra determinado. Para ello, se recuperan 5 ml de cada suspensión celular empleando una pipeta con puntas cortadas por su extremo para que se recojan las células en suspensión. Estos volúmenes de muestra se llevan a tubos de vidrio de 10 ml graduados. Se espera 1 hora después de la toma de muestras para la recogida de datos.

### 3.6.2. Conductividad

La conductividad se asocia con el consumo de nutrientes por las células, en donde una bajada de la misma, significa una disminución en la concentración de nutrientes (sales) en el medio. Para su medición se emplea un conductivímetro Cryson.

### 3.6.3. pH

El pH mide la cantidad de iones de hidrógeno que se liberan al medio líquido debido a la producción de metabolitos por parte de las células en suspensión así como a su ruptura celular, acidificando el medio. Se emplea para su medición un pHmetro Cryson.

De las muestras recogidas anteriormente, se extrae el sobrenadante con una pipeta de cristal y se vierte en tubos de plástico. Se colocan los tubos con la muestra en una gradilla y se mide el pH y conductividad. Una vez que se realizaron las mediciones, se congelan los sobrenadantes en el congelador de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 3.7. Estudio de peroxidasas y fenoles

Pasadas 24h del inicio de la suspensión se procede a la recogida de muestras a tiempo 0, 30 y 60 minutos. En este caso, es necesario realizar una diálisis en tampón Tris HCl 50 mM (pH 7,5) del sobrenadante, cambiando 1 vez dicho tampón, para eliminar las sales que se encuentran en el medio de cultivo.

La diálisis se lleva a cabo en bolsas, que previamente a su uso, tienen que haber sido hidratadas con agua destilada, lavándose exhaustivamente por dentro y por fuera con la ayuda de un vaso lavador. Se preparan paquetes con las bolsas de diálisis (en forma de caramelo), atando un extremo de la bolsa con un cordón, luego se añade la muestra con una pipeta de cristal, y finalmente, se ata el otro extremo de la bolsa con otro cordón largo, ya que lo hay que etiquetar con el número de muestra. Se colocan las muestras en un recipiente que contiene el tampón Tris HCl 50 mM (pH 7,5) y se coloca en un agitador a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.

Transcurrido el tiempo, se recogen las muestras dializadas con la ayuda de una pipeta de vidrio, realizando un corte en el paquete de diálisis. Las muestras se colocan en eppendorf de 1,5 ml (3 por cada muestra) y se llevan a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.7.1. Medición actividad peroxidasa

La medida de la actividad peroxidasa utilizando 4-metoxi- $\alpha$ -naftol como sustrato, se realizó mediante el método descrito por Ferrer *et al.* (1990).

Los medios de reacción estaban compuestos por 10  $\mu\text{l}$  de 4-metoxi- $\alpha$ -naftol 1mM, 25  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,33 mM, 915  $\mu\text{l}$  de tampón Tris ClH 50 mM (pH 7,5) y 50  $\mu\text{l}$  de muestra. Los incrementos de absorbancia se realizaron a 593 nm utilizando un espectrofotómetro ThermoElectronCorporation.

Las actividades enzimáticas obtenidas en todos los ensayos se calcularon en unidades/ml.

### 3.7.2. Medición fenoles (Singleton and Rossi, 1965)

El contenido de fenoles se determinó usando el reactivo de Folin-Ciocalteu de acuerdo con el método de Singleton and Rossi (1965) y realizando una recta de calibrado de ácido gálico en un rango de concentraciones de 0,01 mg ácido gálico/ml, 0,02 mg ácido gálico/ml, 0,05 mg ácido gálico/ml a 0,1 mg ácido gálico/ml.

Para ello, se mezclan 100  $\mu$ l de muestra con 1 ml de reactivo de Folin y se incuba durante 4 minutos. Se añade 1 ml de  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  al 7% y 400  $\mu$ l de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,33 mM, se agita en el vortex y se incuba durante 90 minutos. Se mide la cantidad de fenoles en el espectro ThermoElectronCorporation a 725 nm.

Los valores de absorbancia obtenidos se expresan en equivalentes de ácido gálico/ml

## 4. RESULTADOS y DISCUSIÓN

### 4.1. Obtención de *vitro plant*

La primera parte de un proceso de cultivo *in vitro* es la desinfección del material vegetal junto con el secado del mismo en cámara de flujo. Se trata de 2 pasos muy importantes para la obtención de *vitro plant* ya que al tratarse de medios de cultivo ricos en nutrientes, son medio ideales para el crecimiento de bacterias y hongos.

En primer lugar las semillas se envuelven en una gasa y se someten a un lavado en etanol al 70% seguido de un lavado en hipoclorito sódico al 20%. A continuación las semillas se llevan a la cámara de flujo laminar, en dónde se realizarán 3 lavados consecutivos con agua estéril. A continuación las semillas se depositan en un papel estéril y se dejan 30 minutos secar( Fig.6).

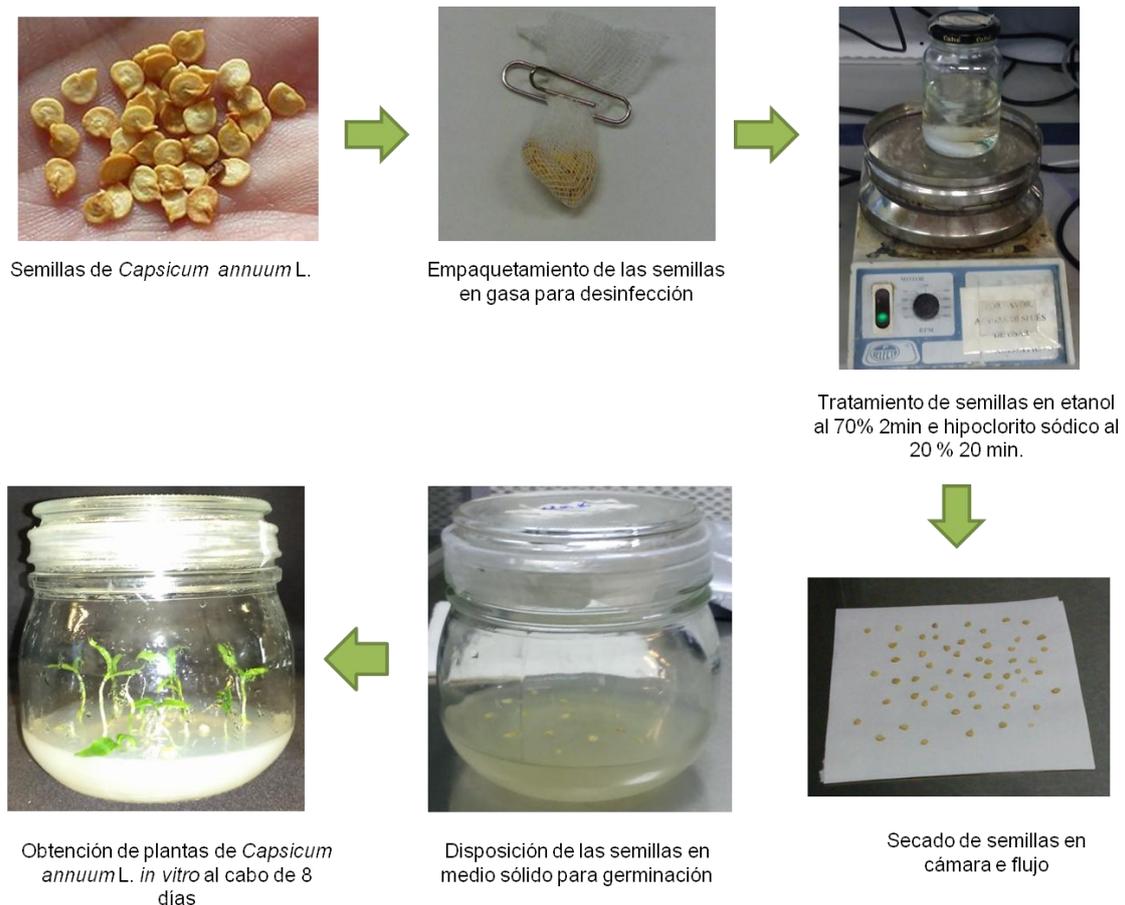


Fig. 6. Esquema para la obtención de *vitro plant*.

## 4.2. Obtención de callos y repicado

Tras la obtención de las plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) *in vitro*, se realiza la inducción a callo y su posterior repicado a partir de las mismas (Fig. 7).

En este proceso, las plantas ya deben tener un buen tamaño y presentar hojas, tallos, raíces y ápices. Se eligen aquellas plantas que presenten un buen aspecto, ausencia de clorosis o señales de decaimiento. Se eliminan las hojas viejas y raíces de la plántula, mientras que los tallos, hojas jóvenes y ápice se utilizan como explantes. Se realizan cortes de 0.5 cm de las partes mencionadas anteriormente en la cámara de flujo laminar. Los fragmentos de dichas plantas van a ser utilizados para la formación de callo, se disponen en placas Petri con medio sólido suplementado con 2,4-D y kinetina. Para dicha disposición, es necesario, la colocación de los fragmentos en círculo dejando separación entre ellos. Como se necesitan condiciones asépticas, las placas son selladas correctamente para evitar cualquier contaminación y se cultivan a oscuridad en una cámara de cultivo, siguiéndose el crecimiento de la formación de callo.

Al cabo de 10 días, se observa como en los extremos de los fragmentos comienza la formación de callo. Cuando ya se observa una cantidad considerable de callo, se produce el repicado del mismo. Para ello, se recortan los bordes y se coloca estos fragmentos de callo todo apilado en el centro de una placa Petri, se sella correctamente la placa, se coloca en oscuridad en la cámara de cultivo y se espera a su crecimiento (Fig. 7).

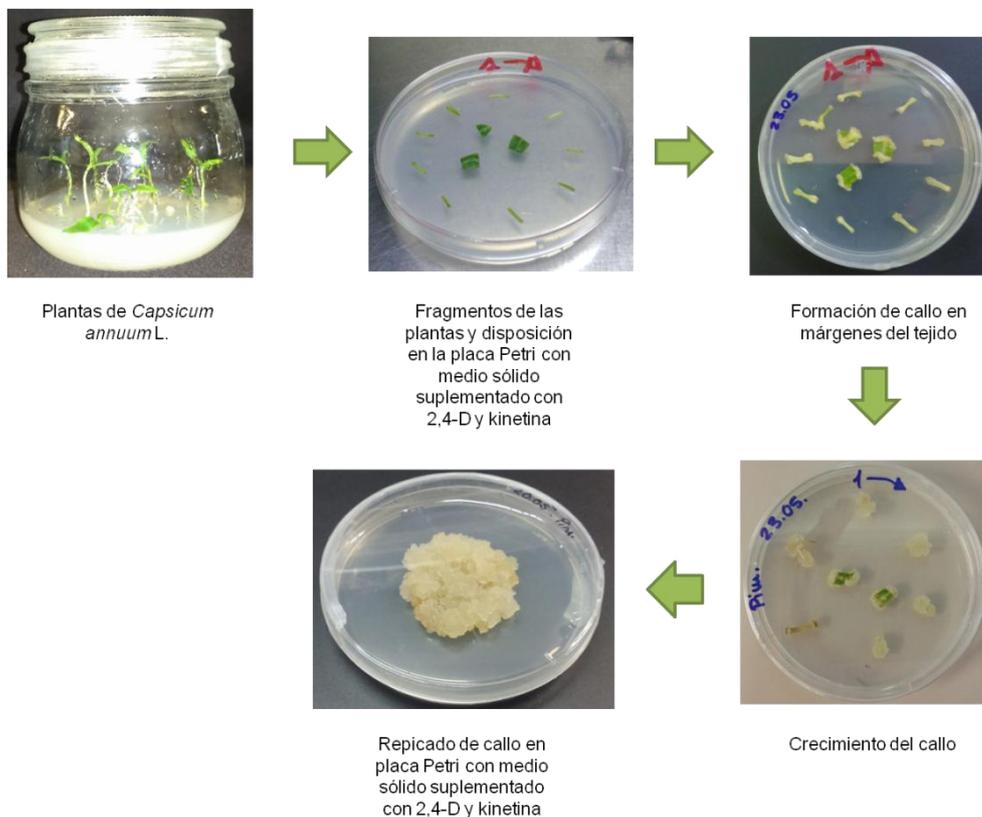
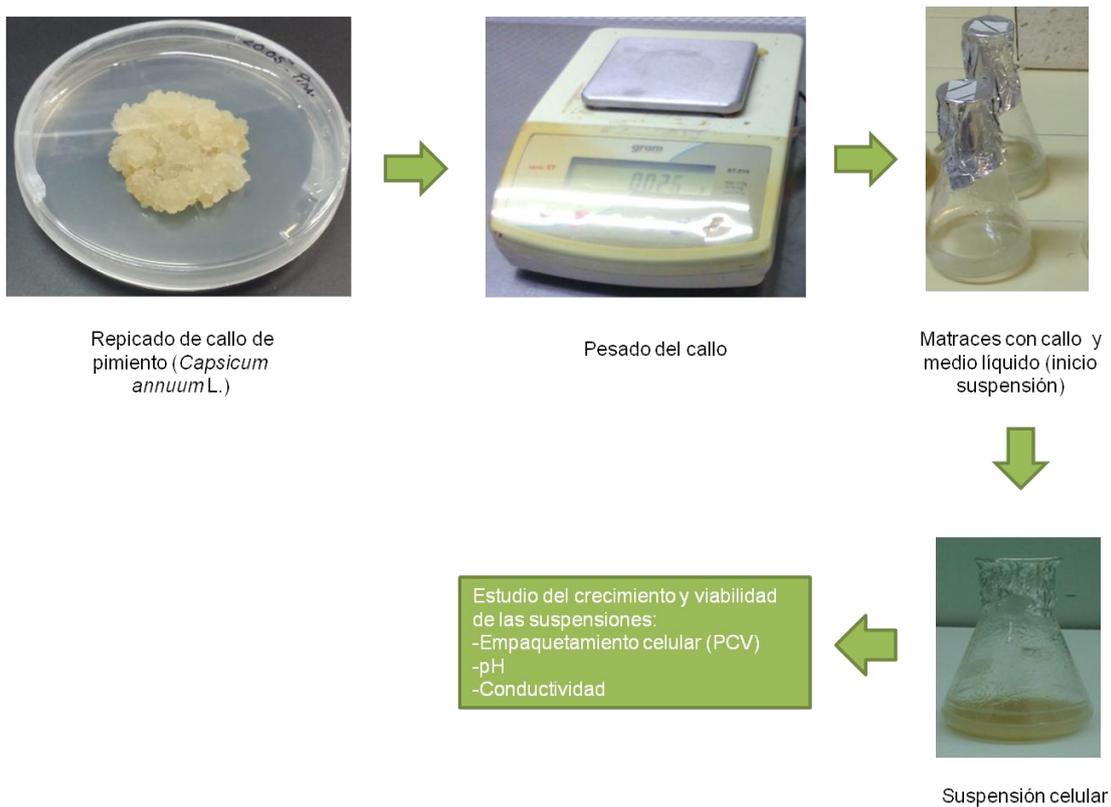


Fig. 7. Esquema para la obtención de callo.

### 4.3. Obtención de suspensiones celulares

Para iniciar la inducción de suspensiones celulares, se pesan 8 gr de callo friable y se lleva a un erlenmeyer con 40 ml de medio líquido suplementado con 2,4-D y kinetina. Tras esta mezcla, se obtiene una suspensión celular de color blanca, en la cual se encuentran diluidos los callos que se añaden. Se incuban en oscuridad en agitación continua en la cámara de cultivo, y pasada una semana, se observan cambios. Estos cambios son un anillo de crecimiento en el borde del erlenmeyer y cambio de color de las suspensiones, adquiriendo un color más oscuro al mismo tiempo que se observa un aumento claro de la densidad. Cuando esto ocurre, se lleva a cabo el repicado de las suspensiones, añadiendo a la suspensión el mismo volumen de medio líquido fresco. A continuación se reparte en 2 erlenmeyer. Una vez que se produce el crecimiento en las suspensiones celulares repicadas, se produce el estudio de la viabilidad y crecimiento celular en dichas suspensiones (Fig. 8).



**Fig. 8. Esquema para la formación de suspensiones celulares.**

## 4.4. Análisis de las suspensiones celulares

### 4.4.1. Empaquetamiento celular (PVC), conductividad y pH

Los datos obtenidos sobre el PCV, pH y conductividad se recogen en las siguientes imágenes (Fig. 10), (Fig.11) y (Fig.12).

El empaquetamiento celular, aporta información sobre la tasa de crecimiento de las suspensión celular (Gómez- Vásquez *et al.* 2004). Este parámetro permite observar la presencia de 4 fases: una fase lag, una fase exponencial, una fase de transición y una fase exponencial (Fig. 9).

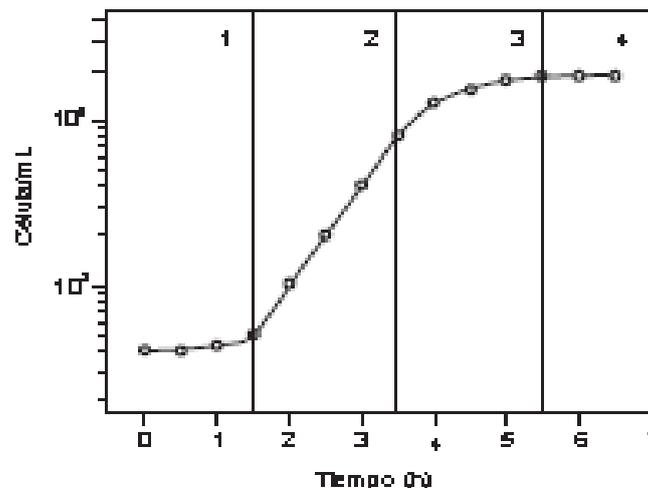


Fig. 9. Representación de las fases del crecimiento celular. (1) Fase lag, (2) Fase exponencial, (3) Fase de transición y (4) Fase estacionaria. Tomado de: Ramírez et al. 2005

En nuestros resultados (Fig. 10) se puede observar las dos primeras fases. Esto es una fase lag, en donde las células están adaptándose a la nueva condición y una fase exponencial en donde se producen el crecimiento celular.

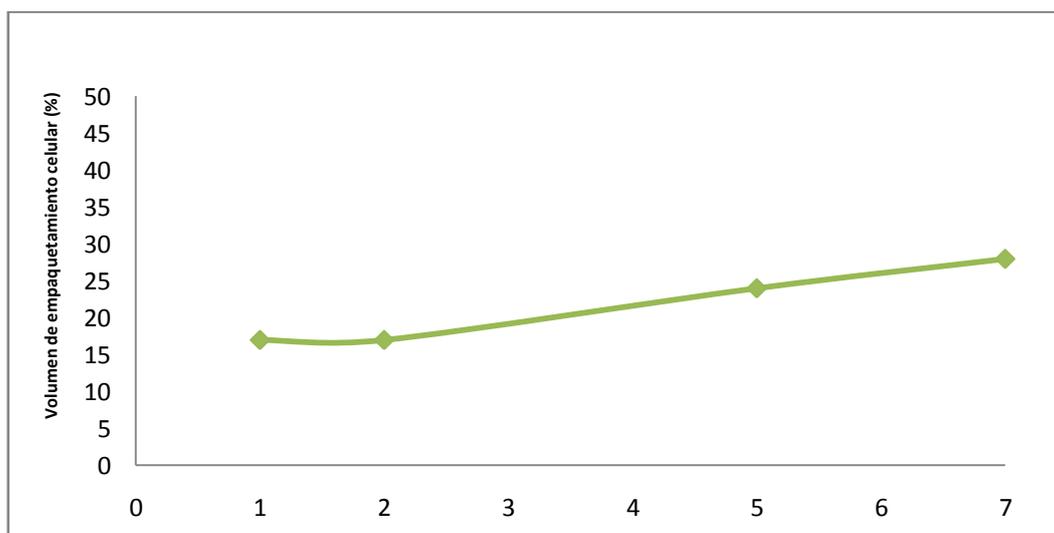
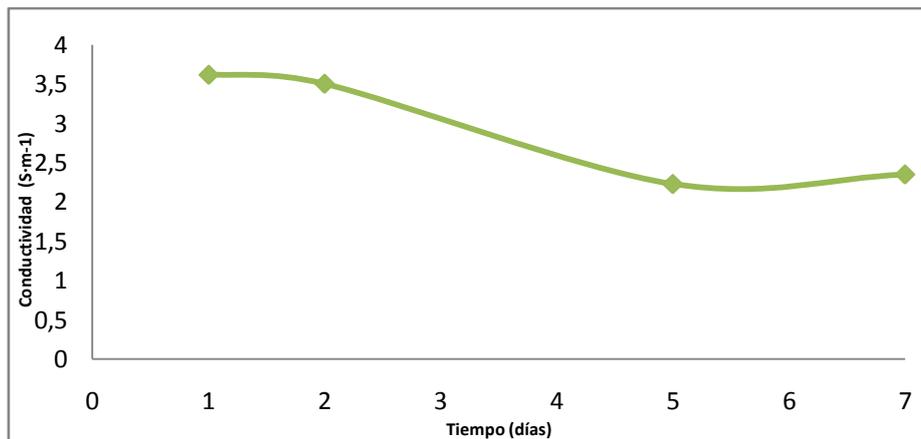


Fig. 10. Representación del empaquetamiento celular en suspensiones celulares.

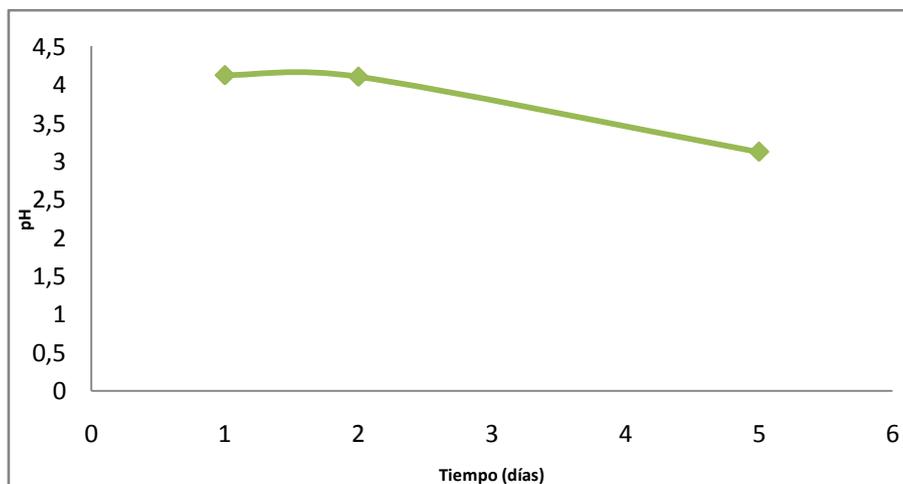
Nuestra gráfica, debido a que la recogida de datos cesa a los 8 días, se puede observar la ausencia de las fases de transición y estacionaria para completar la curva de crecimiento típica, la cual generalmente se completa en 28 días (Bernal, MA comunicación personal).

En lo referente a la conductividad (Fig. 11) se observan valores altos hasta los 2 días, a partir del cual se produce un descenso acusado de la misma. Esto se debe a que, a medida que las células de las suspensiones celulares crecen consumen más nutrientes, reduciéndose la presencia de sales en el medio y obteniéndose dichos valores.



**Fig. 11. Representación de la conductividad en suspensiones celulares.**

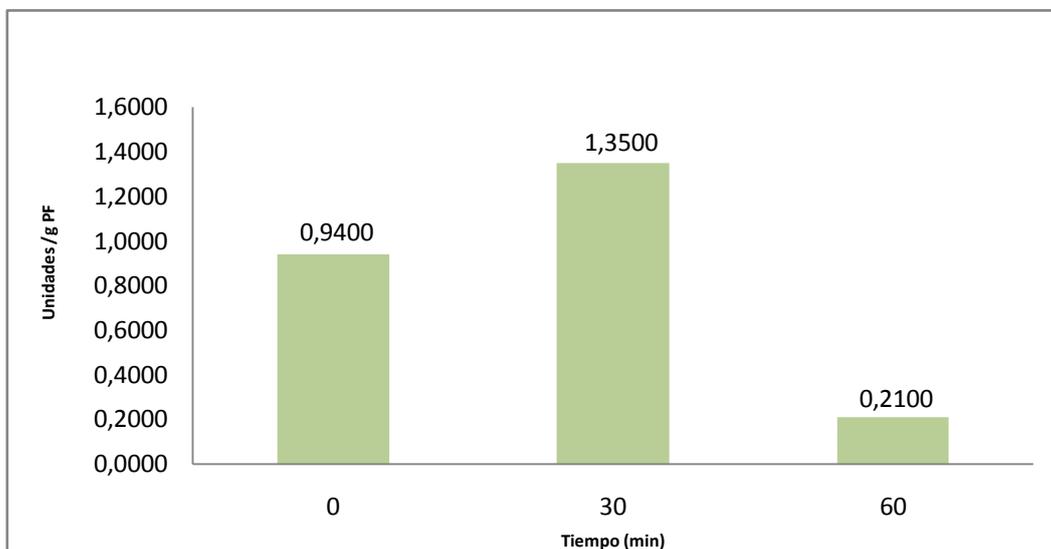
Finalmente, relacionado con el pH (Fig. 12) se observa como en el caso anterior, unos valores altos de pH en las muestras hasta los 2 días seguido de un descenso de los valores del mismo. El motivo por el que se produce esta situación, se debe a que, acompañando al crecimiento celular, puede existir un cierto grado de ruptura celular, lo cual provoca la acidificación del medio.



**Fig. 12. Representación del pH en suspensiones celulares.**

#### 4.4.2. Actividad peroxidasa

Hemos medido la actividad peroxidasa usando 4-metoxi- $\alpha$ -naftol como sustrato en suspensiones celulares observándose los siguientes resultados (Fig. 13).

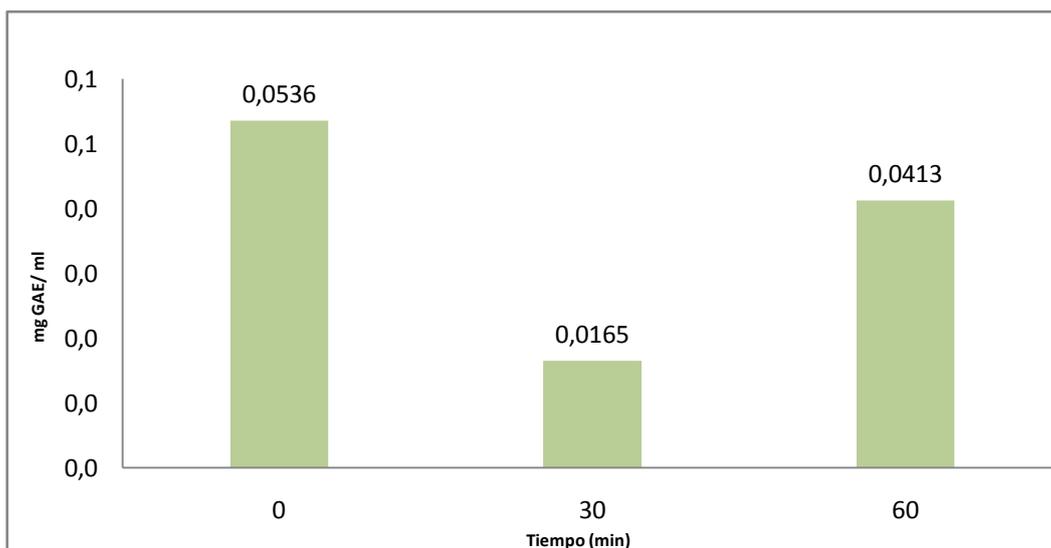


**Fig.13. Representación de la actividad peroxidasa.**

En el gráfico se observa que existe mayor actividad peroxidasa en las muestras recogidas a tiempo 30, mostrando una actividad inferior a los 0 y 60 minutos.

#### 4.4.3. Fenoles

Hemos determinado la presencia de compuestos fenólicos mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu en suspensiones celulares a tiempo 0, 30 y 60 minutos (Fig. 14).



**Fig. 14. Representación de los fenoles totales.**

En la Figura 14 se observa que la mayor concentración de fenoles se encuentra en las muestras recogidas a tiempo 0, sufriendo un descenso de la misma en la recogida realizada a los 30 minutos, pero que finalmente, en la última toma de muestras, dicha

concentración de fenoles se vuelve a incrementar, sin llegar a alcanzar los valores del momento 0.

Se observa que, en relación a la actividad peroxidasa y fenoles existe una relación inversa entre ambas. Las peroxidasas coinciden en la mayor parte de los casos con la fase de crecimiento activo celular (López-Arnaldos *et al.* 2002). Sin embargo, en ciertas ocasiones puede inhibir la elongación celular, mediante la formación de entrecruzamientos fenólicos entre polímeros matriciales. Esto puede ser una de las posibles causas de los resultados obtenidos, en donde se obtienen valores bajos de fenoles coincidiendo con valores altos en peroxidasa y podrían estar de acuerdo con resultados obtenidos por otros autores como Almargo *et al.* (2009).

## 6. CONCLUSIONS

- The preparation of the solid medium without hormones to obtain *vitro* plant was correct, because *Capsicum annuum* L. seedlings were obtained in good condition after 6-8 days.
- The solid medium supplemented with 2,4-D and kinetin was correct for callus induction, because callus growth was induced in 30 days and we can replicate .
- The liquid medium supplemented with 2,4-D and kinetin, was optimal for induction and growth of cell suspensions, in which a good cell growth and presence of peroxidases and phenolics were observed.

## 6. CONCLUSIONES

- La elaboración del medio sólido sin hormonas para la obtención de *vitro* plant fue correcto, debido a que se obtuvieron plántulas de *Capsicum annuum* L. en buenas condiciones.
- El medio sólido suplementado con kinetina y 2,4-D fue el correcto para la inducción a callo ya que se indujo su formación en 30 días y permitió su posterior repicado.
- El medio líquido suplementado con kinetina y 2,4-D, ha sido óptimo, para la inducción y crecimiento de las suspensiones celulares, en las cuales se observa un buen crecimiento celular y presencia de peroxidasas y fenoles.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Almagro, L, Ros, LG, Belchi-Navarro, S, Bru, R, Barceló, AR and Pedreño, MA. (2009). Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany*.60:377-390.
- Benderradji, L, Brini, F, Kellou, K, Ykhlef, N, Djekoun, A, Masmoudi, K and Bourzerzour, H. (2012). Callus Induction, Proliferation and Plantlets Regeneration of Two Bread Wheat (*Triticumaestivum* L.) Genotypes under Saline and Heat Stress Conditions. *International Scholarly Research Network Agronomy*.2012: 1-8.
- Bernal, MA, Casal, T, Collar, X, Díaz, X, Meixide, XA and Rivera, A. (2012). 3ª *Xornadas técnicas sobre do pemento do Couto*. Narón (A Coruña): Deputación da Coruña.
- Bodhipadma, K. (2002). *Plant tissue culture investigations on Capsicum annum L.: Somatic embryogenesis, in vitro flowering, fruiting and seed formation* (Tesis doctoral). University of Canterbury. New Zealand.
- Bourgau, F, Gravot, A, Milesi, S and Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *PlantScience*. 161: 839-851.
- Estrada, B, Bernal, MA and Merino, F. (2000). *Maduración del pimiento de padrón. Transformaciones bioquímicas*. A Coruña. Universidade da Coruña.
- Ferrer, MA, Calderón AA, Muñoz, R and Ros Barcelo, A. (1991). 4-Methoxy- $\alpha$ -naphthol as a specific substrate for kinetic, zymographic and cytochemical studies on plant peroxidase activities. *Phytochemical Anaysis*.1: 63-69.
- García, H and Vázquez, R. (1998). Cuantificación de proteínas: una revisión. *BioTecnología*. 3: 77-88.
- Gómez-Vásquez R, Day R, Buschmann H, Randles S, Beeching JR and Cooper RM. (2004). Phenylpropanoids, phenylalanine ammonia lyase and peroxidases in elicitor-challenged cassava (*Manihotesculenta*) suspension cells and leaves. *Annals of Botany*. 94: 87-97.
- Gupta, SD and Ibaraki, Y. (2006). *Plant tissue Culture Engineering*. Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Hussain, A, Ahmed, I, Nazir, H and Ullah, I. (2012). Plant tissue culture: Current Status and Opportunities. En Leva, A and Rinaldi, LMR, *Recent Advances in Plant in vitro Culture*. (1-28). InTech.
- Ikeuchi, M, Sugimoto, K and Iwase, A. (2013). Plant Callus: Mechanisms of Induction and Repression. *The Plant Cell*. 25: 3159-3173.
- Kumar, N and Reddy, M. (2011). *In vitro* Plant Propagation: A Review. *Journal of ForestScience*. 27(2): 61-72.

López-Arnaldos, T, Ferrer ,M, Calderón García, AA and Muñoz, R. (2002). Changes in peroxidase activity and isoperoxidase petter during strawberry (*Fragaria x ananassa*) callus development. *Journal Plant Physiology*. 159:429-436.

Mroginsky, LA and Roca, WM. (1991). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. En Mroginsky, LA and Roca, WM, *Cultivo de tejidos en la Agricultura: fundamentos y aplicaciones*. (19-40). Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.

Mustafa, NR, Winter, W, van Iren, F and Verpoorte, R. (2011). Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nature Protocols*. 6(6).

Orlinska, M and Nowaczyk, P. (2015). *In vitro* plant regeneration of 4 *Capsicum* spp. genotypes using different explant types. *Turkish Journal of Biology*. 39: 60-68.

Pérez-Alonso, N and Jiménez, E. (2011).Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Bioteconología Vegetal*. 11(4): 195-211.

Ramírez, J, Contreras, G and Gómez, MC. (2005). La fase estacionaria en la basteria *Escherichia coli*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 47(3-4): 92-101.

Szabados, L, Mroginsky, LA and Roca, WM. (1991). Suspensiones celulares: descripción, manipulación y aplicaciones. En Mroginsky, LA and Roca, WM, *Cultivo de tejidos en la Agricultura: fundamentos y aplicaciones*. (173-195). Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.

Singleton, VL and Rossi, JA. (1965). Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*.16: 144-158.

Van Eck, JM and Kitto, SL. (1990). Callus Initiation and Regeneration in *Mentha*. *HortScience*. 25(7): 804-806.