

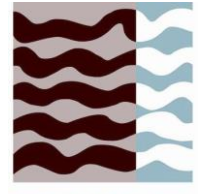


Universidad
Politécnica
de Cartagena



UPCT

Escuela Técnica Superior de
Ingeniería Agronómica



ETSIA

*Máster Universitario
en Técnicas Avanzadas en Investigación
y Desarrollo Agrario y Alimentario*

Análisis comparativo de crecimiento de *Nicotiana
benthamiana* y *N. tabacum* en cultivo in vitro

Autora: Dña. Fuensanta Verdú Navarro

Dirección: D. Marcos Egea Gutiérrez-Cortines

Codirección: D. Juan Antonio Moreno Cid

Cartagena, diciembre de 2020

Índice

Resumen	1
Abstract.....	1
1. Introducción.....	2
1.1. El cultivo in vitro y la biotecnología vegetal	2
1.2. Biorreactores y biotecnología vegetal.....	3
2. Objetivos.....	4
3. Materiales y métodos.....	4
3.1. Materiales.	4
3.1.1. Medios de cultivo.....	4
3.1.2. Material vegetal.	6
3.2. Métodos.	6
3.2.1. Esterilización semillas.....	6
3.2.2. Cultivo in vitro.....	6
3.2.3. Análisis crecimiento celular.	7
3.2.4. Determinación de la influencia de la luz en la producción de callo.	7
3.2.5. Análisis bioinformático.....	8
4. Resultados y discusión	8
4.1. Germinación semillas.....	8
4.2. Crecimiento plántulas.....	10
4.3. Producción de callo.....	16
4.3.1. Producción de callos de <i>Nicotiana benthamiana</i>	16
4.3.2. Producción de callos de <i>Nicotiana tabacum</i>	17
4.3.3. Comparación directa y resumen general.	20
4.4. Cultivo celular en matraz.....	21
5. Conclusiones	26
6. Agradecimientos.....	28
7. Bibliografía	28

Índice de tablas

Tabla 1. Componentes del Medio 1 con su respectiva concentración.....	5
Tabla 2. Componentes del Medio 2 con su respectiva concentración.....	5
Tabla 3. Componentes del Medio 3 con su respectiva concentración.....	5
Tabla 4. Densidad óptica medida a una longitud de onda de 600nm de cada matraz. .	26

Índice de figuras

Figura 1. Semillas germinadas de <i>N. Tabacum</i> tras siete días de cultivo.	9
Figura 2. Semillas germinadas de <i>N. Bethamiana</i> tras siete días de cultivo.....	9
Figura 3. Plántulas de <i>N. benthamiana</i> y <i>N. tabacum</i> crecidas in vitro en recipientes con Medio 1 tras (A) 19 días, (B) 26 días, (C) 37 días y (D) 65 días de cultivo.....	10
Figura 4. Hojas extraídas de plantas crecidas in vitro de <i>N. benthamiana</i> (arriba) y <i>N. tabacum</i> (abajo).....	11
Figura 5. Plántulas de <i>N. benthamiana</i> con botones florales (círculos blancos) sin desarrollarse de forma completa.....	11
Figura 6 Aparición de meristemoides en pedicelos florales (señalados con los círculos blancos).	12
Figura 7. Arriba: Resultado del BLAST realizado frente al genoma de <i>N. benthamiana</i> depositado en la base de datos de SOLGenomics. Abajo: secuencia de <i>Solanum lycopersicum</i> en formato FASTA empleada para hacer el BLAST.	13
Figura 8. Arriba: Resultado del BLAST realizado frente al genoma de <i>N. benthamiana</i> depositado en la base de datos de SOLGenomics. Abajo: secuencia de <i>Arabidopsis thaliana</i> en formato FASTA empleada para hacer el BLAST.....	13
Figura 9. Imagen del alineamiento múltiple de los genes de anantha de <i>N. benthamiana</i> . En este extracto del alineamiento se puede observar la región menos conservada entre estos genes.....	14
Figura 10. Alineamiento de las secuencias de las dos proteínas anantha obtenidas como resultado del BLAST realizado para <i>N. tabacum</i>	15
Figura 11. Árbol filogenético de anantha generado con las proteínas anantha o UFO de las especies <i>Vitis vinífera</i> , <i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Capsicum annum</i> , <i>Nicotiana benthamiana</i> , <i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Petunia x hybrida</i> , <i>Antirrhinum majus</i> , <i>Sphagnum fallax</i> y <i>Amborella trichopoda</i>	15
Figura 12. Callos producidos en placa con medio de inducción de callo de <i>N. benthamiana</i> cultivados en condiciones de oscuridad (izquierda) y con un fotoperiodo luz/oscuridad (derecha).....	16
Figura 13. Callos de <i>N. benthamiana</i> donde se han desarrollado raíces adventicias (círculo blanco).	17
Figura 14. Imagen de un callo de <i>N. benthamiana</i> refrescado en recipiente.....	17
Figura 15. Placa con callos producidos en placa de <i>N. tabacum</i> crecidos con un fotoperiodo de luz/oscuridad con una contaminación producida por hongo.	18
Figura 16. Imagen de un callo de <i>N. tabacum</i> refrescado en recipiente. El callo ha crecido internándose en el medio de cultivo sólido (derecha).	18

Figura 17. Imágenes de callos de <i>N. tabacum</i> producidos en placa en condiciones de oscuridad total.	19
Figura 18. Imágenes de callos de <i>N. tabacum</i> crecidos en placa en condiciones de luz/oscuridad.	20
Figura 19. Imagen de un callo de <i>N. tabacum</i> (izquierda) y de un callo de <i>N. benthamiana</i> (derecha), refrescados ambos en recipientes.	21
Figura 20. Representación gráfica del incubador empleado para realizar los ensayos. Los matraces están etiquetados con letras (A-D) correspondientes al etiquetado que se empleó en el ensayo. Las fuentes de calor y luz están representadas con flechas, señalando la dirección con las que incidían. Las zonas representadas en gris equivalen a paredes opacas del incubador que no dejaban pasar la luz.	22
Figura 21. Imágenes de los matraces donde se cultivaron las células vegetales a los _ días de la inoculación. A,B son los matraces situados cerca de la fuente de calor: A en la zona expuesta a menos luz, B en la zona que recibía más cantidad de luz. C,D se corresponden con los matraces situados en el lado opuesto de la fuente de calor: C recibía más luz, D estaba en la zona más oscura del incubador.	22
Figura 22. Imagen de los matraces empleados para el cultivo de las células vegetales justo después de la inoculación.	23
Figura 23. Imagen de los matraces empleados en el cultivo celular, tras 5 días de cultivo en el incubador.	24
Figura 24. Imagen de los matraces empleados en el cultivo celular, tras 12 días de cultivo.	25
Figura 25. Gráfica con los pesos de los matraces en cada fecha de medición.	26

Listado de abreviaturas

2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético)
ANA (ácido naftalenacético)
6-BA (6-bencilaminopurina)
BY-2 (<i>Bright Yellow 2</i>)
OD600 (Densidad óptica a 600nm)
MS (Murashige y Skoog)
BLAST (<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
NCBI (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)

Resumen

El cultivo *in vitro* es una técnica muy empleada en investigación vegetal, siendo uno de los pilares de la biotecnología vegetal. Las especies *Nicotiana tabacum* y *Nicotiana benthamiana* son utilizadas como sistemas modelo en la investigación vegetal. En este trabajo, se va a establecer un cultivo *in vitro* de estas dos especies vegetales, bajo las mismas condiciones de cultivo, con el fin de observar si las diferencias que existen entre ellas, morfológicas y fenotípicas, se traducen en diferencias en el crecimiento bajo condiciones de cultivo *in vitro*. Más concretamente, se busca determinar si estas condiciones afectan a la velocidad de crecimiento y la cantidad de biomasa producida. Dentro del tiempo de este trabajo, se podría concluir que no hay diferencias significativas en cuanto a estos parámetros de crecimiento, aunque serían necesarios más ensayos para corroborar estos datos preliminares. Con los cultivos obtenidos se pretende, en próximas investigaciones, realizar los ensayos en biorreactores, y analizar de nuevo si ahí el crecimiento es semejante o difiere entre las especies.

Abstract

In vitro culture is a technique widely used in plant research, being one of the pillars of plant biotechnology. *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana benthamiana* are two species used as model systems in plant research. In this work, an *in vitro* culture of these plant species will be established, under the same culture conditions, in order to observe if the morphological and phenotypic differences that exist between them result into differences in growth under *in vitro* culture conditions. More specifically, the aim is to identify if these conditions affect the growth rate and the amount of biomass produced by these plants. Within the timeframe of this work, we concluded that there are no significant differences regarding these growth parameters, although more trials would be necessary to corroborate the preliminary data. With the *in vitro* cultures obtained, it is intended, in future investigations, to carry out the experiments in bioreactors, in order to analyse if growth is similar or differs between these two species.

1. Introducción

1.1. El cultivo in vitro y la biotecnología vegetal

Durante la historia de la humanidad, las plantas han jugado un papel importante en nuestras vidas a diferentes niveles. El uso de las plantas más notable es el de proveer alimentos y otros productos para consumo humano. Sin embargo, gracias a los avances e investigaciones que se han desarrollado con el paso de los años, se empiezan a desarrollar nuevos usos y productos provenientes de estos organismos, así como nuevos métodos para optimizar la producción de los que ya se conocían con anterioridad.

Uno de los desarrollos que ayudó a continuar con los avances en este campo de la ciencia es el cultivo in vitro, tanto de tejidos vegetales en concreto como de plantas completas. Este método, proporciona una amplia variedad de posibilidades en cuanto al ámbito de investigación se refiere. Mediante el cultivo in vitro se pueden cultivar diferentes tejidos que de forma convencional no podrían crecer; se pueden producir también clones de una planta madre; se obtienen cultivos libres de patógenos; con los cultivos que se generan se pueden hacer transformaciones genéticas; se pueden hacer simulaciones de diferentes condiciones para ver el efecto que éstas producen en la planta, etc. Sin embargo, hay diferencias muy significativas entre especies e incluso entre diferentes genotipos en cuanto al crecimiento en cultivo in vitro se refiere, y por ello se han de hacer investigaciones para caracterizar cada especie y genotipo, y ver qué condiciones son las óptimas para su crecimiento.

En este ensayo se han elegido dos especies vegetales de gran importancia en el ámbito de la investigación para hacer su cultivo in vitro: *Nicotiana tabacum* y *Nicotiana benthamiana*. Ambas son organismos modelo. *N. tabacum* es un referente en la biología molecular vegetal, dado que fue la especie empleada para el estudio de la organogénesis, así como para demostrar la totipotencia de las células vegetales (Budzianowska 2009; Vasil y Hildebrandt 1965). También fue de las primeras especies en ser modificada genéticamente mediante *Agrobacterium tumefaciens* (Hoekema et al. 1983).

Por su parte, *Nicotiana benthamiana* se ha empleado como modelo en estudios sobre las relaciones planta-patógeno, gracias a su capacidad de poder ser infectada por una gran variedad de patógenos, tanto virus, como bacterias, hongos, entre otros (Goodin et al. 2008; Pombo et al. 2020). Recientemente, se ha empezado a estudiar su potencial para la producción de vacunas (Bolaños-Martínez y Rosales-Mendoza 2020) y para la producción de anticuerpos (Gomes et al. 2019), entre otros. El desarrollo de vacunas en plantas está ganando popularidad en estos años debido a que tienen menor coste que otros sistemas de expresión y no presenta tanto riesgo en cuanto a la propagación de patógenos que puedan afectar a humanos, como ocurre con otros sistemas de expresión que suelen emplearse para estos fines. Además, si las plantas

con las que se trabaja son comestibles, se podría incluso pensar en el desarrollo de vacunas orales, evitando así problemas relacionados con la administración de las vacunas.

Aunque las dos especies pertenecen al género *Nicotiana*, pertenecen a diferentes subgéneros y secciones (Aoki y Ito 2000), lo que hace que tengan ciertas características, tanto genéticas como fenotípicas, que difieren entre ambas.

El motivo de haber escogido estas dos especies vegetales es para hacer un análisis comparativo del crecimiento de ambas bajo las mismas condiciones de cultivo, y comprobar si las diferencias genotípicas que las hacen pertenecer a diferentes subgéneros dentro de la misma especie se traducen en diferencias fenotípicas que afecten a su crecimiento in vitro en dichas condiciones, desde la germinación de las semillas hasta el cultivo celular en matraz, pasando por la producción de callo.

Adicionalmente, se plantea la influencia de la presencia y ausencia de luz en la producción de callo in vitro, tanto en la velocidad de aparición de callo, en la cantidad de biomasa producida y en la morfología de los callos que se formen. Se ha visto en otros estudios que la luz puede afectar a estos parámetros en *N. tabacum* (Siddique y Islam 2018; Seibert, Wetherbee, y Job 1975; Huxter, Reid, y Thorpe 1979), y se quiere ver si esto también ocurre con la especie *N. benthamiana*.

1.2. Biorreactores y biotecnología vegetal

Una vez conseguido establecer el cultivo in vitro, se puede emplear para el desarrollo de nuevas investigaciones y proyectos como, por ejemplo, el cultivo de células en biorreactores. Un biorreactor se define como cualquier recipiente o sistema dentro del cual se llevan a cabo reacciones biológicas, como su propio nombre indica. Estas reacciones pueden ser llevadas a cabo por organismos, como bacterias, hongos, células animales y vegetales, o por sustancias bioquímicamente activas, como las enzimas. Recientemente, el cultivo de células vegetales ha despertado un gran interés, debido a que son capaces de producir determinadas proteínas que en organismos procariontes no es posible, además de ser resistentes a virus animales y estar mejor adaptadas que las células de origen animal (Huang et al. 2009; Huang y McDonald 2012). También destacan por la producción de metabolitos de origen vegetal con aplicaciones de gran relevancia, sobre todo en el sector farmacéutico (Jian-Jiang Zhong 2001).

Originalmente, en esta investigación se pretendía llegar a realizar ensayos con los cultivos celulares en biorreactores, pero debido a que los primeros pasos del cultivo in vitro tuvieron que ser postpuestos por el confinamiento, no se pudieron realizar a tiempo estos últimos y se decidió realizarlos más adelante sin incluirlos dentro de esta investigación.

Otra de las razones de escoger en concreto estas dos especies de *Nicotiana* fue por este propósito de hacer un cultivo en biorreactor. El presente trabajo se ha realizado

dentro de la empresa BIONET, que tiene una línea de productos basada en el desarrollo y comercializado de biorreactores llave en mano. Por lo tanto, el desarrollo tecnológico basado en células de tabaco es importante dado que es un tipo celular importante en la biotecnología vegetal. El cultivo en biorreactor de células de *N. tabacum* ha sido muy estudiado y empleado, existiendo bastante literatura sobre ello (Ho, Henderson, y Rorrer 1995; Lee et al. 2004; Lee y Kim 2006; Shibasaki et al. 1992). Así se han llevado a cabo importantes trabajos sobre ciclo celular en la variedad Bright Yellow-2 conocida como BY2, siendo la división celular el componente principal del crecimiento de células en cultivo en matraces o biorreactores (Sorrell et al. 1999). Sin embargo, el trabajo con *N.benthamiana* cada vez es más importante dado su potencial para producir proteínas de interés farmacéutico como por ejemplo proteínas del virus del EBOLA (Phoolcharoen et al. 2011). Además, se ha podido modificar genéticamente como “chasis” para el desarrollo de productos de alto valor añadido producidos en planta completa o en cultivo in vitro (Li et al. 2016; Strasser et al. 2008; Nekrasov et al. 2013) . Por lo tanto, se ha decidido hacer un cultivo de cada una de ellas en biorreactores para comparar el crecimiento y optimizar las condiciones de cultivo de ambas para obtener la mayor cantidad de biomasa, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en estudios anteriores de otros grupos de investigación.

2. Objetivos

Los objetivos de este trabajo son:

1. Establecer un cultivo in vitro tanto de *N. benthamiana* como de *N. tabacum*, comenzando con semillas esterilizadas hasta llegar a obtener un cultivo celular en medio líquido. Estos cultivos en medio líquido se emplearán para futuros ensayos en biorreactores.
2. Determinar las posibles diferencias y semejanzas en el crecimiento de ambas especies vegetales en cada etapa del proceso de cultivo in vitro.
3. Medir influencia de la presencia o ausencia de luz en la aparición de células indiferenciadas y la cantidad de éstas, así como su morfología.

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales.

3.1.1. Medios de cultivo.

Para estos experimentos se emplearon medios de cultivo con diferentes composiciones, dependiendo del propósito de cada uno de ellos. A continuación, se describe la composición de cada medio, su cometido y cómo se prepararon (Tablas 1-3).

- **Medio 1. Medio de germinación.** Utilizado para la germinación de las semillas y para el posterior desarrollo de las plántulas, así como para trasplantar y renovar las plántulas ya crecidas.

Tabla 1. Componentes del Medio 1 con su respectiva concentración.

Compuesto	Concentración
MS	4.9 g/L
Sacarosa	25 g/L
Gelrite	2.5 g/L

- **Medio 2. Medio de inducción de callo.**

Tabla 2. Componentes del Medio 2 con su respectiva concentración.

Compuesto	Concentración
MS (Vitaminas)	4.3 g/L
Sacarosa	30 g/L
Inositol	0.1 g/L
2,4-D	0.1 mg/L
ANA	2.5 mg/L
6-BA	1 mg/L
Agar	8 g/L

- **Medio 3. Medio de cultivo celular en matraz.**

Tabla 3. Componentes del Medio 3 con su respectiva concentración.

Compuesto	Concentración
MS (Vitaminas)	4.3 g/L
Sacarosa	30 g/L
Inositol	0.1 g/L
2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético)	0.1 mg/L
ANA (ácido naftalenacético)	2.5 mg/L
6-BA (6-bencilaminopurina)	1 mg/L

Para hacer los medios se utilizaron botellas autoclavables, a las que se les añadió primero agua hasta la mitad del volumen final, después se agregaron los componentes en las cantidades necesarias y se enrasó con agua hasta llegar al volumen final deseado. Todos los otros compuestos se pueden autoclavar sin que se alteren, excepto las hormonas (2,4-D, ANA, 6-BA) que son termolábiles. Por esta razón, las fitohormonas no se añadieron hasta alcanzar una temperatura adecuada tras la esterilización mediante autoclave. La esterilización, como se ha mencionado antes, se hizo en todos los casos autoclavando las botellas con el medio de cultivo en su interior a 121°C durante 20 minutos.

Después de esterilizar el medio de cultivo, cuando se enfrió lo suficiente, se sirvió en condiciones asépticas dentro de la cabina de flujo laminar. Dependiendo del tipo de

medio y su uso, se alicuotó en diferentes recipientes: placas redondas/cuadradas, recipientes, matraces. Si el medio contenía agar o gelrite, se dejaba reposar hasta que solidificase para guardarlo en el frigorífico, si el medio era líquido, se guardaba directamente en el frigorífico hasta que se utilizase.

3.1.2. Material vegetal.

Las semillas de *N. tabacum* fueron cedidas por el Dr. Benito Pineda Chaza de la Universidad Politécnica de Valencia. La variedad empleada fue *Bright Yellow 2* (BY-2).

Las semillas de *N. benthamiana* han sido cultivadas en el grupo desde hace cinco años.

3.2. Métodos.

3.2.1. Esterilización semillas.

La esterilización de las semillas, tanto de *N. tabacum* como de *N. benthamiana*, se hizo siguiendo un protocolo establecido:

1. Se prepara una bolsa de tela tipo muselina, o malla, donde introducir las semillas.
2. Se introduce la bolsa en una disolución compuesta por 50% lejía comercial, 50% agua destilada y una gota de Tween 20, aproximadamente 200µL en 200 mL, durante diez minutos.
3. Tras los primeros diez minutos, se procede a realizar los enjuagues con agua destilada, tres enjuagues cada uno de diez minutos en tres recipientes diferentes.
4. Una vez hecho el último enjuague, las semillas estarán listas para su cultivo *in vitro*.

3.2.2. Cultivo *in vitro*.

3.2.2.1. Germinación de semillas.

Tras la esterilización de las semillas se procedió al cultivo *in vitro* de éstas en placas Petri que contenían el medio de cultivo adecuado para propiciar su germinación (Medio 1). El cultivo se realizó en una cabina de flujo laminar en condiciones estériles para evitar contaminaciones. Se incubaron las placas en una cámara de cultivo con control de temperatura, humedad y luz, hasta que las semillas germinaron y hubiesen generado plántulas.

3.2.2.2. Crecimiento de las plántulas.

Cuando las plántulas tenían un tamaño adecuado, de cotiledones abiertos, se trasladan a recipientes con el mismo medio de cultivo (Medio 1) para que pudiesen seguir desarrollándose. Para ello, se seleccionó un determinado número de plántulas de cada variedad y se traspasaron de las placas a contenedores en la cabina de flujo laminar, dejando espacio suficiente entre ellas para que no inhibiesen su crecimiento entre sí, y se volvieron a incubar en la cámara de cultivo con control de temperatura, humedad y luz, con un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad, durante 65 días aproximadamente.

3.2.2.3. *Producción de callo.*

Una vez pasado ese tiempo, se observó que las plántulas habían crecido lo suficiente y se comenzó el procedimiento para la producción de callo, que es el siguiente:

1. Selección de material vegetal a partir del cual se producirá el callo. En este caso fueron las hojas.
2. Disección de las hojas de la planta madre con la ayuda de tijeras, pinzas y bisturí. Este paso y los siguientes se realizan en condiciones asépticas dentro de la cabina de flujo laminar.
3. Generación de heridas en las hojas mediante cortes generados con el bisturí o las tijeras.
4. Deposición de los fragmentos de hojas en placas de Petri con el medio de cultivo específico para promover la producción de callo (Medio 2).
5. Dependiendo de la especie, dejar el cultivo 2-3 semanas hasta la aparición de callo de tamaño superior a 3-4 mm.

Cuando se realizó el paso de los callos a matraces, también se hizo un refresco de los callos en recipiente con el Medio 2.

3.2.2.4. *Cultivo celular en medio líquido.*

Cuando se consideró que los callos tenían el tamaño adecuado (3-4 mm), se pasó al siguiente procedimiento: el cultivo celular en medio líquido. Para ello, de los callos generados en el paso anterior, se extrajeron porciones y se introdujeron en matraces con Medio 3, para que siguiesen produciendo células indiferenciadas, pero, en este caso, en medio líquido. Los matraces empleados fueron de 500mL, con un volumen de trabajo de 100mL para que hubiese una mayor superficie para el intercambio de gases y, por consiguiente, una mejor aireación. Estos matraces se pusieron en un incubador con agitador orbital a 28°C y con una agitación de 150rpm.

3.2.3. *Análisis crecimiento celular.*

Para analizar el crecimiento celular en medio líquido se empleó el método de densidad óptica, ya que este método se ha visto en otros estudios que se correlaciona con otro parámetro empleado para el estudio del crecimiento celular: el peso seco, o en inglés "Dry Cell Weight" (Godoy-Hernández y Vázquez-Flota 2005).

Se tomó como blanco el Medio 3 sin inocular. La longitud de onda escogida fue de 600nm. Sin embargo, no se analizó el crecimiento hasta que se decidió que el crecimiento se podía dar por terminado, debido a que las condiciones del laboratorio no eran las óptimas y se podían contaminar durante la manipulación para tomar muestras.

Adicionalmente, los matraces se pesaron cada 2-3 días en un granatario con precisión de ± 0.1 gr. para ver y analizar tanto el crecimiento celular como el aumento en la biomasa dentro de los matraces sin comprometer la viabilidad del cultivo.

3.2.4. *Determinación de la influencia de la luz en la producción de callo.*

Para observar si la luz y la oscuridad eran factores determinantes en la aparición y producción de callo, se incubaron la mitad de las placas que contenían los fragmentos

de hojas en oscuridad, dentro de una caja en la cámara de cultivo, mientras que la otra mitad se mantuvo en condiciones de luz/oscuridad con el fotoperiodo establecido en la cámara de cultivo, mencionado anteriormente.

3.2.5. Análisis bioinformático.

Las herramientas que se emplearon para los análisis bioinformáticos llevados a cabo fueron las siguientes:

- Para la búsqueda de genes homólogos se empleó el programa BLAST (Altschul et al. 1990). La base de datos donde se hizo la búsqueda fue en Sol Genomics Network (SGN) (Fernandez-Pozo et al. 2015). En esta base de datos se encuentran los genomas de *N. benthamiana* y de *N. tabacum*, así como el de otras especies de la familia de las solanáceas (como *Solanum lycopersicum* y *Capsicum annuum*). También se hizo una búsqueda en la base de datos de Phytozome (Goodstein et al. 2012) y en la del NCBI (NCBI Resource Coordinators et al. 2018).
- Para el alineamiento múltiple de las secuencias de los genes se utilizó el programa denominado Clustal Omega (Larkin et al. 2007; Sievers et al. 2011).
- Para el análisis filogenético y la construcción del árbol filogenético se hizo uso de la página web Phylogeny.fr (Dereeper et al. 2008). Esta página emplea diferentes herramientas para hacer los análisis y generar un árbol filogenético, con unas secuencias dadas. Primero hace un alineamiento, en este caso fue con la herramienta MUSCLE (Edgar 2004b; 2004a), después se hizo una limpieza con Gblocks (Castresana 2000), para eliminar las posiciones que no concordasen bien y las regiones que fuesen muy diferentes. Con los resultados obtenidos se hizo un análisis filogenético con PhyML (Guindon et al. 2010) y con el resultado se generó el árbol filogenético con TreeDyn (Chevenet et al. 2006).

4. Resultados y discusión

4.1. Germinación semillas.

Tras siete días de cultivo, se observó que las semillas habían germinado y habían dado lugar a plántulas con los cotiledones y raíces bien desarrollados en su mayoría, tanto en *N. tabacum* (figura 1) como *N. benthamiana* (figura 2).

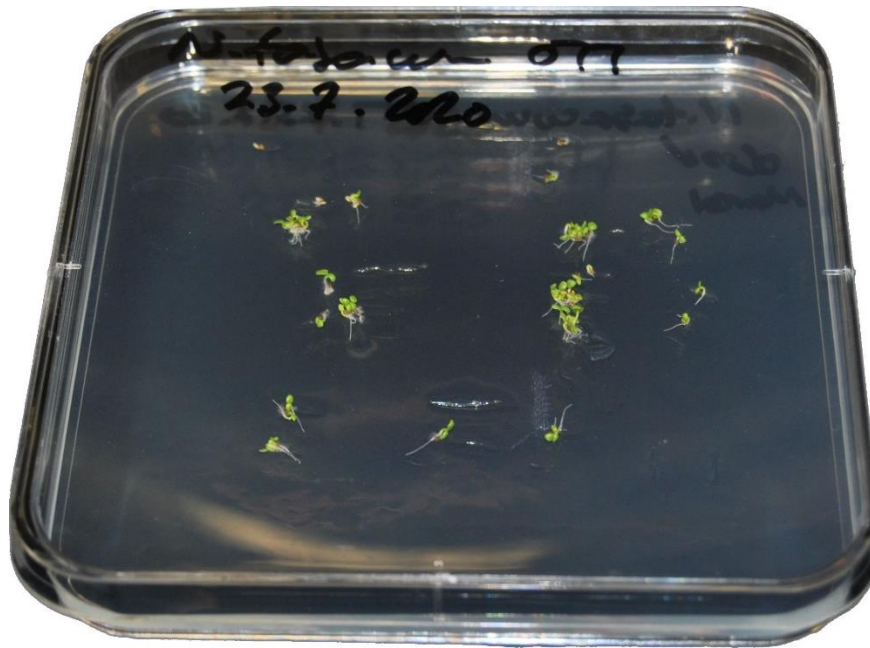


Figura 1. Semillas germinadas de *N. Tabacum* tras siete días de cultivo.

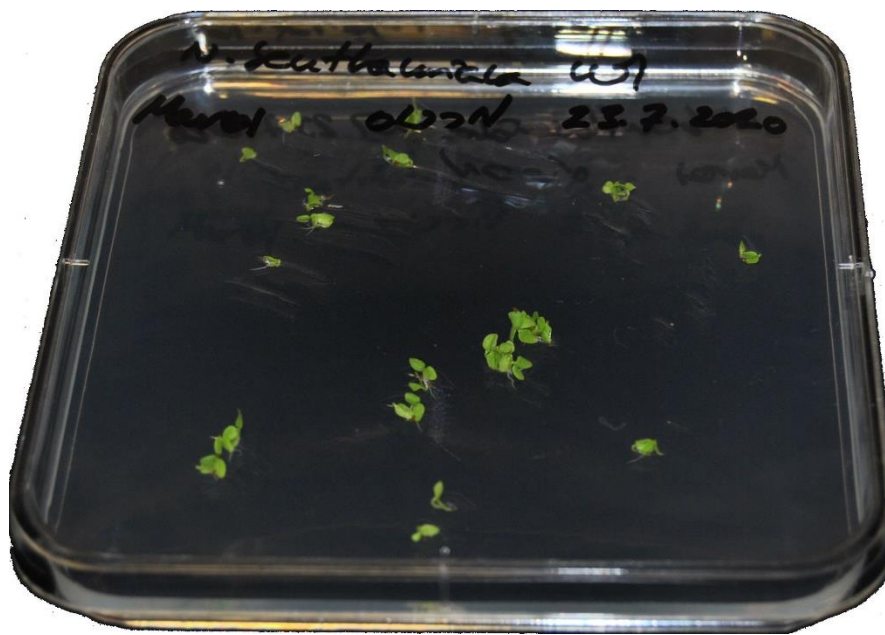


Figura 2. Semillas germinadas de *N. Bethamiana* tras siete días de cultivo.

La germinación fue favorable en ambos casos, la proporción de semillas germinadas fue alta. No hubo contaminaciones en las placas donde fueron cultivadas, así como tampoco se dañaron las semillas por el proceso de esterilización. No se vieron diferencias en la velocidad de germinación de las semillas de las diferentes especies, aunque sí hubo diferencias en el tamaño de los cotiledones y las raíces: *N. benthamiana* tenía unos cotiledones de mayor tamaño con respecto a los de *N. tabacum*; mientras que, si nos fijamos en las raíces, las de *N. tabacum* eran más grandes.

4.2. Crecimiento plántulas.

Las plántulas de ambas especies crecieron de forma satisfactoria tras el paso de placa a recipiente en las condiciones establecidas en la cámara de cultivo. Se puede apreciar una mayor diferencia en el crecimiento de estas especies en cuanto a sus fenotipos y su morfología.

Por un lado, tenemos a *N. benthamiana* con un tamaño de hojas menor, pero con mayor cantidad de éstas y un color más claro. Mientras que las plántulas de *N. tabacum* tienen las hojas de mayor tamaño, aunque no tenga un alto número de ellas, y presentan un color verde más oscuro. En cuanto a la velocidad de crecimiento, no se aprecian diferencias notables entre las especies.

En la figura 3, se puede observar cómo se desarrollan las plántulas con el paso del tiempo, siendo la diferencia de la velocidad de crecimiento entre ambas especies inapreciable.



Figura 3. Plántulas de *N. benthamiana* y *N. tabacum* crecidas *in vitro* en recipientes con Medio 1 tras (A) 19 días, (B) 26 días, (C) 37 días y (D) 65 días de cultivo.

En la figura 4 se ve la diferencia de tamaño y pigmentación de las hojas de ambas especies. Esta diferencia se puede atribuir, como ya se ha mencionado en párrafos anteriores, al fenotipo y la morfología propias de cada especie, más que a una diferencia en el crecimiento.



Figura 4. Hojas extraídas de plantas crecidas in vitro de *N. benthamiana* (arriba) y *N. tabacum* (abajo).

Aparte de las diferencias nombradas antes, se observaron dos acontecimientos adicionales que diferían entre las plántulas de estas dos especies. El primero es que aparecieron flores en algunas de las plántulas de *N. benthamiana* (figura 5), mientras que en *N. tabacum* no apareció ninguna. Aunque las flores que aparecieron no se llegaban a desarrollar del todo. La posible explicación de que en *N. tabacum* no apareciesen flores es que debe de cultivarse durante más tiempo para que las plantas alcancen la etapa de floración y sean capaces de desarrollar flores. Aunque bien podría ser también debido a que las condiciones de cultivo no fueron las óptimas para esta especie y por eso no llegó a producir flores.

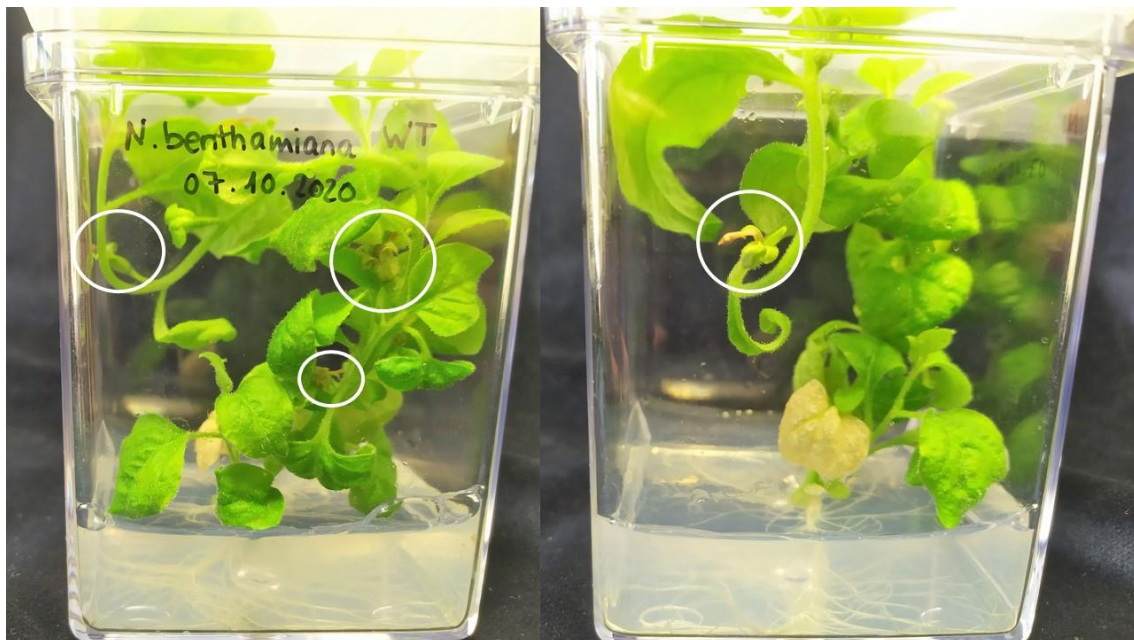


Figura 5. Plántulas de *N. benthamiana* con botones florales (círculos blancos) sin desarrollarse de forma completa.

La segunda diferencia fue la aparición de masas de células indiferenciadas en la zona nodal en las plántulas de *N. benthamiana*, fenómeno que no ocurrió en *N. tabacum* de nuevo. En la figura 6 se pueden ver dos plantas en las que aparecieron las masas de células mencionadas antes, su aspecto se asemeja al de un callo. El medio de cultivo

donde crecieron estas plantas no contenía hormonas adicionales, por lo tanto, la aparición de estas masas celulares no era a causa de las fitohormonas.

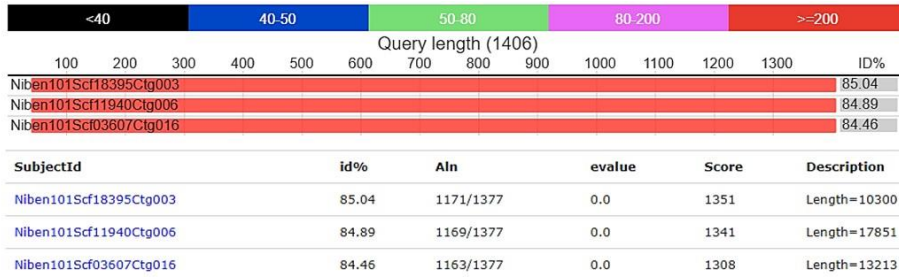


Figura 6 Aparición de meristemoides en pedicelos florales (señalados con los círculos blancos).

La hipótesis planteada para dar una explicación a este fenómeno es que ha habido una inhibición anormal de un gen denominado *anantha* en tomate, ortólogo del gen UFO (*Unusual Floral Organs*) y ha dado lugar a la generación de meristemoides ectópicos. La función del gen UFO en *Arabidopsis thaliana* está relacionada con el desarrollo de los órganos de la flor, mientras que en la familia de las solanáceas (donde se incluye el tomate y *N. benthamiana*) este gen coordina la velocidad del desarrollo del meristemo.

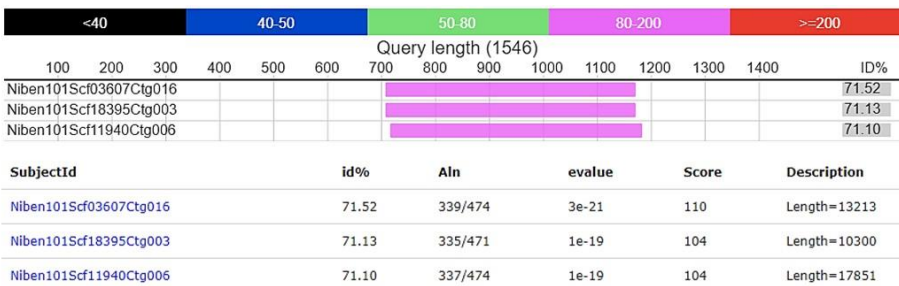
Revisando la literatura se ha visto que en plantas de *Arabidopsis thaliana* con una mutación que provoca la sobreexpresión del gen UFO, el fenotipo se asemeja al observado en las plantas de *N. benthamiana* (Risseeuw et al. 2013). En otra especie de la familia de las solanáceas, más concretamente, en el pimiento, también se ha observado un fenotipo similar, relacionado con mutaciones en el gen *anantha* (Lippman et al. 2008).

Por otro lado, se hizo un análisis bioinformático para buscar si este gen estaba presente en el genoma de *N. benthamiana* y se encontraron 3 genes con alta similitud con el gen de tomate (figura 7) y el gen de *Arabidopsis* (figura 8). Estos 3 genes después se compararon entre sí mediante una herramienta de alineamiento múltiple (figura 9) y resultaron ser el mismo, pero dos de ellos tenían una secuencia de menor longitud, por lo que se deduce que estos dos son copias parciales del primero. Para validar la hipótesis planteada se podría extraer tejido tanto de la masa celular, como de otras partes de la planta, y hacer una PCR cuantitativa, con cebadores para estos genes, y poder analizar así su expresión. Si se observase que la expresión de estos genes en la masa celular es diferente comparada con la expresión de éstos en otros tejidos de la planta, este sería el gen causante de la malformación.



>FJ190668.1 Solanum lycopersicum cultivar M82 ANANTHA (AN) mRNA, partial cds
 ATGGAAGCTTTTCATCATCCCCATTAGCTTTCACATTCCTATGCTTTTCCTATCCCAACCAACAACCAATTTTCTGGAACTCCAAATTCATC
 ATCAGTTAATGGAATGATCATCAACACTTGGATGGATAGTAGAATTTGGAGTAGACTTCCACATAGGCTTATTGATAGAATCATTGCTTTTCTACCAC
 CACCTGCTTCTTTAGAGCTAGAGTTGTGTGAAGAGATTCTATGGACTTATTTACTCTACACATTTTCTTGAATGTACTTGCAGTTTCACCTAAG
 AGGAACTGGTTCAATTTCTTTAAACAAAAAGTACCAAGAAACAACATTTACAAGAAGCTGATGAATAGTAGTAACCTCAGGAGTTTGTCTGTGGAAGG
 TTACTTGTGTTGATCCTGATAAATCTTTGTTGGTATAGGCTTCTTTTGTCTTTAATCCCAAGGGTTTCTCCTGTTTCATCTTCTGGTGGATTAATTT
 GCTTTGTTTCTGATGAATCTGGATCAAAAAACATCTTTTATGTAATCCACTTGTAGGATCCATAATTCCTTGCCTCCAACCTTAAGGCCATAGGCTT
 TTTCTTCTATTGGTTAACTATAACCAACACATCTATTGATATAGCTGTAGCTGGAGATGACTTGATATCACCTTATGCTGTTAAAAACTTAACTAC
 AGAGTCATTTTCATATGGTAAATGGATTTTACTCAATATGGGGTACAACCTTACACTTCCAAGATTATGCAGTTTGAATCAGGCAAAATGGTGC
 ATGTACAGGGGAGATTTTATGATGAATTTAGTCCCTTTAGTGTGCTTTCTTATGATATAGGACTAATAAAGTGGTCAAGATTCAAGCCCCGATG
 CGACGATTCCTACGTTACCGAGCCTTGTGGAAGGGAATGGTAAGGTTGTTTTAGTTGCAGCAGTTGAAAAGAGTAACTGAATGTGCCAAGAGTTT
 GAGGCTTTGGGCATTGCAAGATTGTGGTACAATGTGGTGGAAATAGAAAGAATGCCACAACAATTGTATGTGCAGTTTGGCTGAAGTGGAGAATGGAC
 AAGGTTTTAGTTGTGTTGGACATGGTGAATATGTGGTGAATGATTAAGAATAATTGAGATAAGGCATTGTTGTTGATTTCTGTAAGAAGAGATGG
 ATTTGGATACCTCTTGTCCATTTTGGGAAATAATTTAGACTATGGTGGTGGTGGTAGTAAATAATTTGTGGAGAATTTGGAGTTGGAGGGGG
 AGAGTTGCATGGATTTGGTTATGACCTAGACTTGTGCACCTATTGGTGCACCTTCTTATGATCAGTTGACATTGCCCTTTCAGTCATTCAACTG

Figura 7. Arriba: Resultado del BLAST realizado frente al genoma de *N. benthamiana* depositado en la base de datos de SOLGenomics. Abajo: secuencia de *Solanum lycopersicum* en formato FASTA empleada para hacer el BLAST.



>NM_102834.2 Arabidopsis thaliana F-box family protein (UFO), partial mRNA
 CACAGAGAAAGACCAAACTTTTGTCTCTTTCTCAAACCTTTTACATATGATCTTTGCTCTTTTCTTCAATATGGGTTTGCATAACTTTCACCAAAACCCCTCC
 TCAAAAGCCCTTACATATTTCCCAACACAAGAAATAAACTCTAAATCCACTTTCACCAAAATCTTTTCATTTTTCAGCTAAAATGGATTCAACTGTGTTTCATCAAT
 AACCCATCTTTAACTTACCTTTTCTTTACACATTTACAGTAGCAGCAACAGTAGCACAACAACGAGCACCACACAGACTCAAGCTCCGGTCAATGGATGGACG
 GTCGGATTTGGAGCAAGCTACCACCTCCTCTTGTGACCGCTCATTGCTTTTCTTCCACCTCCGGCGTTTTTCCGGACACGTTGCGTCTGCAAGAGATTCTACAG
 TCTACTTTTCTCAACACCTTCTCGAGACATATCTACAACACTTCCCTCCGACACAACCTGTTTCTTCTTCAAACAAAAACCCCTAAAGAGTTACATTTAC
 AAGAGAGGAGAAACAACGATGATGATTTCCAAATAAAGCTGAAGGCTTTTTGTTGATCCTAATGAGATCCGATGGTACCGTCTCTCTTTTGTCTTATATCCCTTACG
 GGTTTTATCCTTTCAGGATCATCAGGAGGTTAGTGAGTTGGGTCTCCGAAGAAGCTGGTCTTAAACCATCTCTTGTGTAACCCCTTGTGCGGATCCGTGAGTCA
 GTTGCCACCAATATCAAGGCAAGGCTTTTCCCTTCGATAGGCTCTCGGTAAACCAACCTCTATGATGTTACTGTGCGTGGAGATGATCTCATATCTCCTTAC
 GCTGTGAAAACCTCTCATCGGAGAGTTTCCATGTGACGCGCGGGGATTCTTTCCCTCTGGGCGATGACTTCTTTTGGCCACGGCTTTGTAGCTTGGAAATCTG
 GTAAGATGGTTTACGTGCAAGGCAAGTTTACTGTATGAACATATAGCCCTTTTAGCGTTTTGCTCTATGAAGTACTGAAAACCGGTGGATCAAGATTCAAGCTCC
 GATGAGGAGATTTCTCAGATCTCAAGCTTGTGTAGAGAGCAAGGGAGGCTTATCTTGTAGCAGCTGTTGAGAAAAGCAAGTTGAACGTTCCCAAAAGCCTACGA
 CTTTGGAGTTTGCACAAGATAACGCCATGGGTGAGATCGAACGGATGCCCTAGCCGCTCTACACAGTTTGCAGCAGAAGAAGTTGAAAAGGATTTCGAGT
 GTGTCGGAAATCAAGAGTTTGTAAATGATTTGTTAAGAGGAACCTCGTTGCAGTTGCTGTTGATATAGTGAGAAAAGCTGGCTGTGGGTCCCAACCGTCTCTTA
 CTTCCGCGAGTGGTGGGTTAGCTCAGGTGGCGGTTAGAGGAGAGGCTTTCAGAGGTTTTGCTTATGACCCGGTGTACTACACCGGTGGTTAGTCTTCTTGTGAT
 CAGTTAACACTTCCATTTCTTGGATCTGTTAG

Figura 8. Arriba: Resultado del BLAST realizado frente al genoma de *N. benthamiana* depositado en la base de datos de SOLGenomics. Abajo: secuencia de *Arabidopsis thaliana* en formato FASTA empleada para hacer el BLAST.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

Niben101Scf03607g01005.1   ATGGAAGCTTTTCATGACCTATTAGCTTTCACCTCCCTATGCTTTTCCTATCCCAACA   60
Niben101Scf18395g00001.1   ATGGAAGCTTTTCATGTACCTATTAGCTTTCACCTTCCCTATGCTTTTCCTATCCCAACA   60
Niben101Scf11940g00008.1   ATGGAAGCTTTTCATGTACCTATTAGCTTTCACCTTCCCTATGCTTTTCCTATCCCAACA   60
*****

Niben101Scf03607g01005.1   CCAACAACAAATTTCTTGGAACTACACCAAAATCCATCAATTAATGGTAGCCCTGGATG   120
Niben101Scf18395g00001.1   CCAACAACAAATTTCTTGGAACTACACCAAAATCCATCAATTAATGGTAGCCCTGGATG   120
Niben101Scf11940g00008.1   CCAACAACAAATTTCTTGGAACTACACCAAAATCCATCAATTAATGGTAGCCCTGGATG   120
*****

Niben101Scf03607g01005.1   GATACTAGAATTTGGAGCAGACTTCCACATAGGCTAATTGATAGAATCATTGCTTTTCTT   180
Niben101Scf18395g00001.1   GATACTAGAATTTGGAGCAGACTTCCACATAGGCTAATTGATAGGATCATTGCTTTTCTT   180
Niben101Scf11940g00008.1   GATACTAGAATTTGGAGCAGACTTCCACATAGGCTAATTGATAGGATCATTGCTTTTCTT   180
*****

Niben101Scf03607g01005.1   CCACCACCAGCTTTCTTTAGAGCTAGAGCTGTTTGTAAAAGATTTTATGCCCTTCTCTAT   240
Niben101Scf18395g00001.1   CCACCACCTGCTTTTTAGAG-CTAGAGCTGTTTGCA-----                216
Niben101Scf11940g00008.1   CCACCACCTGCTTTTTAGAG-CTAGAGCTGCAAAA-----                216
*****

Niben101Scf03607g01005.1   TCTAGCACTTTTCTGAATTGTACCTCCAAGTTTCTCCTCAGCCATTGGTTCAATTTTC   300
Niben101Scf18395g00001.1   -----                216
Niben101Scf11940g00008.1   -----                216

Niben101Scf03607g01005.1   TTCAGGCCAAAAATCCCAAGAAACAATATTTACAAGAACAGTAGTAATACTTCTGGTACC   360
Niben101Scf18395g00001.1   -----AAAAATCCCAAGAAACAATATTTACAAGAACAGTAGTAATGCTTCTGGTACT   267
Niben101Scf11940g00008.1   -----A--TCCCAAGAAACAATATTTACAAGAACAGTAGTAATGCTTCTGGTACT   264
*      * * * * * *****

Niben101Scf03607g01005.1   TCTGATCATAGAGTTGAAGGTTACCTCTTTGATCCTGATAATCTTTCTGGTTTAGGCTT   420
Niben101Scf18395g00001.1   TCTGATCATAGAGTTGAAGGTTACCTCTTTGATCCTGATAATCTTTCTGGTTTAGGCTT   327
Niben101Scf11940g00008.1   TCTGATCATAGAGTTGAAGGTTACCTCTTTGATCCTGATAATCTTTCTGGTTTAGGCTT   324
*****

Niben101Scf03607g01005.1   TCTTTTCTTTGATCCCAAGGGTTTTCTCCTGTTTCATCTTCTGGTGGATTAATTTGC   480
Niben101Scf18395g00001.1   TCTTTTGTCTTAATCCCAAGGGTTTTCTCCTGTTTCATCTTCTGGTGGATTGATTTGC   387
Niben101Scf11940g00008.1   TCTTTTGTCTTTGATCCCAAGGGTTTTCTCCTGTTTCATCTTCTGGTGGATTGATTTGC   384
*****

Niben101Scf03607g01005.1   TTTGTTTCTGATGAAGCTGGATCTAAAAATATCGTTTTGTGTAATCCTCTTGTGGATCT   540
Niben101Scf18395g00001.1   TTTGTTTCTGATGAAGCTGGATCTAAAAATATCCTTTTGTGTAATCCTCTTGTGGATCT   447
Niben101Scf11940g00008.1   TTTGTTTCTGATGAAGCTGGATCTAAAAATATCCTTTTGTGTAATCCTCTTGTGGATCT   444
*****

```

Figura 9. Imagen del alineamiento múltiple de los genes de *anantha* de *N. benthamiana*. En este extracto del alineamiento se puede observar la región menos conservada entre estos genes.

Este mismo análisis con la herramienta BLAST se hizo con el genoma de *N. tabacum*, y no se encontraron genes con homología al gen *anantha*, en la base de datos de SolGenomics. Se recurrió a la base de datos del NCBI y se hizo un BLAST con la secuencia de la proteína, obteniendo como resultado dos proteínas con una alta similitud. Tras hacer un alineamiento entre ellas (figura 10), se determinó que poseían casi la misma secuencia.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

XP_016481549.1	MEAFHVPISFHFPPYAFPIPTPTTNFLGTPPNPSINGSPWMDARIWSRLPHRLIDRIIAFL	60
XP_016449455.1	MEAFHAPISFHFPPYAFPIPTPTTNFLGTPPNPSINGSPWMDTRIWSRLPHRLIDRIIAFL	60

XP_016481549.1	PPPAFFRARAVCKRFYALLYSSTFLELYLQISPQRHWFIFFRQKIPRNNIYKNSSNASGT	120
XP_016449455.1	PPPAFFRARAVCKRFYALLYSSTFLELYLQVSPRRHWFIFFRQKIPRNNIYKNSSNASGT	120

XP_016481549.1	SDHRVEGYLFDPDLSWFRLSFALIPQGFSPVSSGGLICFVSDAAGSKNILLCNPLVGS	180
XP_016449455.1	SDHRVEGYLFDPDNLSWFRLSFALIPQGFSPVSSGGLICFVSDAAGSKNILLCNPLVGS	180

XP_016481549.1	MIPLPPTLRPRLFPSIGLITITNSSIDLAVAGDDLISPYAVKNLTTFESHIDGNGFYSIWG	240
XP_016449455.1	MIPLPPTLRPRLFPSIGLITITNSSIDLAVAGDDLISPYAVKNLTTFESHIDGNGFYSIWG	240

XP_016481549.1	TTSSLPRLCSFESGKMVHVEGRFYCMNFSFVLSYDIATNNWCKIQAPMRRFLRSPCLV	300
XP_016449455.1	TTSSLPRLCSFESGKMVHVEGRFYCMNFSFVLSYDVATNNWCKIQAPMRRFLRSPCLV	300

XP_016481549.1	EGNGRLVLAHAVEKSKLNVPRLSLRSLWALQDCGTMWVEIERMPQQLYVQFAEVENGQGFNC	360
XP_016449455.1	EGNGRLVLAHAVEKSKLNVPRLSLRSLWALQDCGTMWVEIERMPQQLYVQFAEVENGQGFNC	360

XP_016481549.1	VGHGQFVVIIKNSDKALLDFDCKRRLWIWIPPCFVGNNDYGVSNYGSFEGGELHGFG	420
XP_016449455.1	VGHGQFVVIIKNSDKALLDFDCKRRLWIWIPPCFVGNNDYGVSNYRSEFGGELQGF	420

XP_016481549.1	YDPRLAAPISALLDQLTLPFQSFN	444
XP_016449455.1	YDPRLAAPISALLDQLTLPFQSFN	444

Figura 10. Alineamiento de las secuencias de las dos proteínas *anantha* obtenidas como resultado del BLAST realizado para *N. tabacum*.

Se decidió realizar más análisis con BLAST de proteínas con otras especies vegetales: *Marchantia polymorpha*, *Vitis vinifera*, *Amborella trichopoda*, *Physcomitrella patens*, *Antirrhinum majus*, *Petunia x hybrida*, *Sphagnum fallax* y con las proteínas resultantes hacer un árbol filogenético. Sin embargo, de la especie *Physcomitrella patens* no se obtuvieron resultados.

Con los genes obtenidos de los análisis con BLAST y los que se habían visto de la literatura (tomate y pimiento), se hizo un análisis filogenético generándose el árbol que aparece en la figura 11. En el análisis se observa que las proteínas ortólogas de *anantha*, de las Solanáceas forman un clado único.

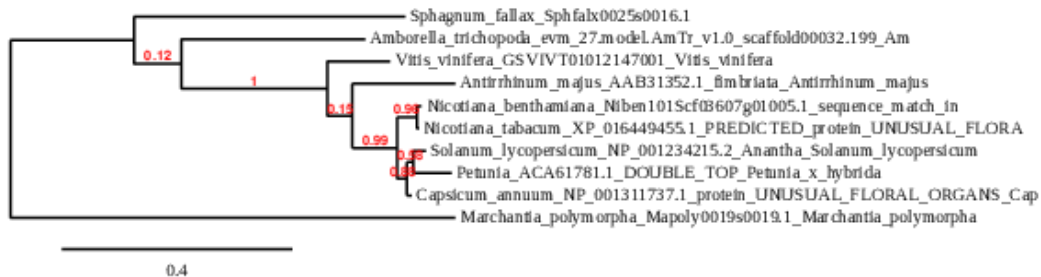


Figura 11. Árbol filogenético de *anantha* generado con las proteínas *anantha* o UFO de las especies *Vitis vinifera*, *Solanum lycopersicum*, *Capsicum annuum*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum*, *Petunia x hybrida*, *Antirrhinum majus*, *Sphagnum fallax* y *Amborella trichopoda*.

4.3. Producción de callo.

Los callos empezaron a aparecer a los 7 días, pero no se consideró que tenían el tamaño suficiente hasta que transcurrieron 25 días. Se pusieron 4 placas de cada especie, con 9 fragmentos de hojas en cada una, todas extraídas de un mismo recipiente. La mitad de las placas se pusieron en condiciones de oscuridad total, y la otra mitad con un fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad.

4.3.1. Producción de callos de *Nicotiana benthamiana*.

En la figura 12 se pueden ver los callos producidos a partir de hojas de *N. Benthamiana*, a la izquierda, tenemos una placa que fue cultivada en oscuridad, por ello el color de las hojas y el callo es más claro, no tiene tanta pigmentación. Mientras que, en la derecha de la figura, se observa un color más verdoso, debido a que esta placa fue cultivada con un fotoperíodo de luz/oscuridad y, por lo tanto, su pigmentación es mayor. En cuanto a producción de biomasa de células indiferenciadas, no se aprecia diferencia entre la placa de luz/oscuridad y la placa de oscuridad.

En ambos casos los callos que se obtuvieron no eran friables, estaban demasiado compactos.

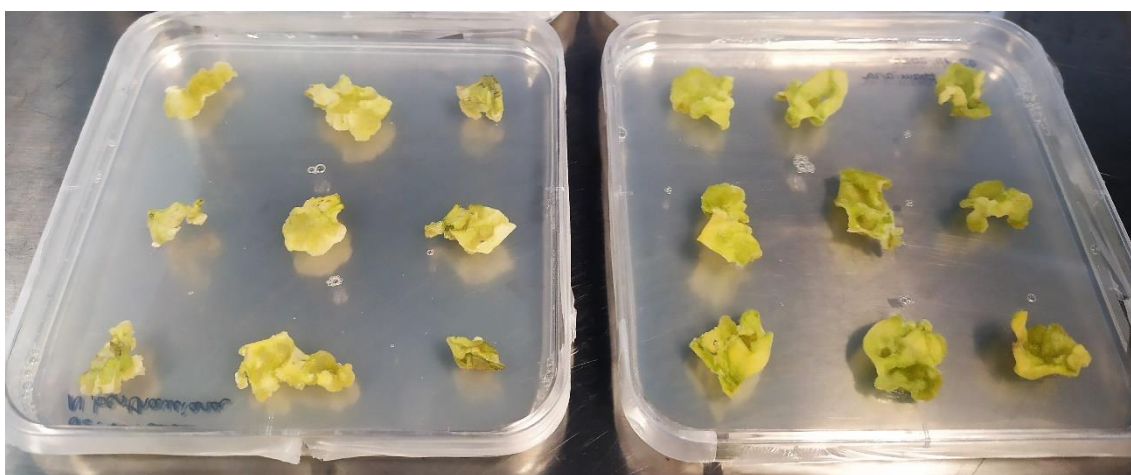


Figura 12. Callos producidos en placa con medio de inducción de callo de *N. benthamiana* cultivados en condiciones de oscuridad (izquierda) y con un fotoperíodo luz/oscuridad (derecha).

Aparte de haberse generado masas de callo, se pudo observar también que en algunas hojas aparecieron raíces adventicias, como se puede observar en la figura 13. La aparición de estos órganos diferenciados puede deberse al efecto de las fitohormonas.

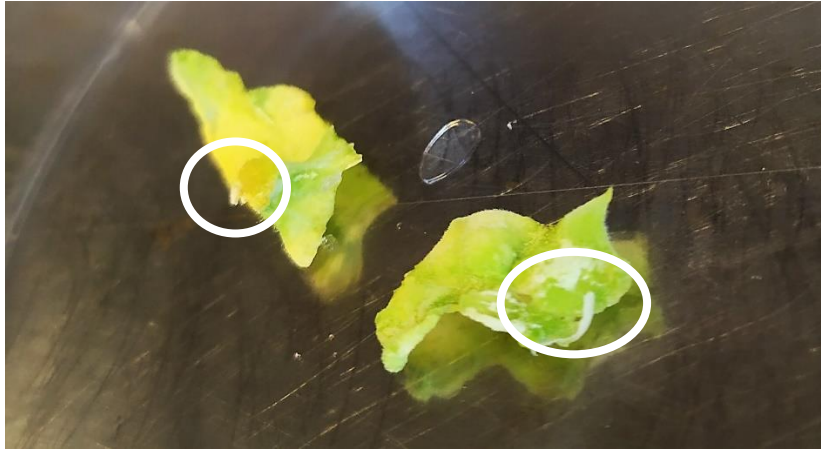


Figura 13. Callos de *N. benthamiana* donde se han desarrollado raíces adventicias (círculo blanco).

Los callos que se refrescaron en recipientes tuvieron resultados diferentes a los obtenidos de las hojas cultivadas en placa. Estos callos presentaban menor grado de compactación, lo que se traduce en una mayor facilidad para su manipulación y disgregación en el paso a medio líquido; es decir, eran callos friables (figura 14). Aparte, la biomasa que se produjo fue mayor. En este caso sólo se incubaron los recipientes en condiciones de luz/oscuridad.

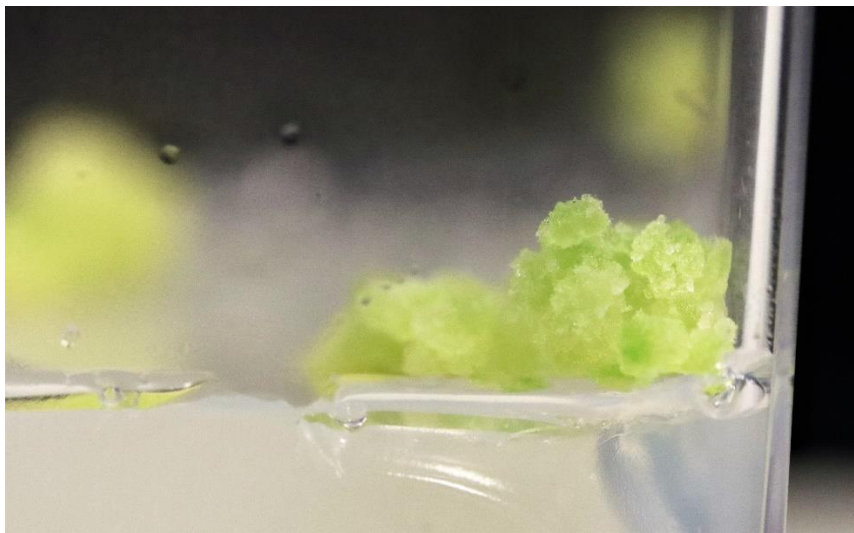


Figura 14. Imagen de un callo de *N. benthamiana* refrescado en recipiente.

4.3.2. Producción de callos de *Nicotiana tabacum*.

En cuanto a las placas de *N. tabacum*, todas acabaron contaminadas y se desecharon. Por esta razón los callos que se habían producido no se consideraron como válidos para continuar con el proceso e inocular los matraces con medio líquido. Se tuvo que repetir el proceso de producción de callo con nuevos fragmentos de hojas. Aun así, en la figura 15 se puede ver una de las placas y los callos que se formaron. Se puede apreciar en determinadas zonas de las hojas una coloración marrón, debida a secreción de compuestos fenólicos. Esta secreción puede haber sido causada por las heridas que se produjeron en la manipulación. Esta coloración se aprecia igualmente en algunas zonas

de la masa de callo, aunque en su mayoría el color está entre tonalidades de verde y amarillo.

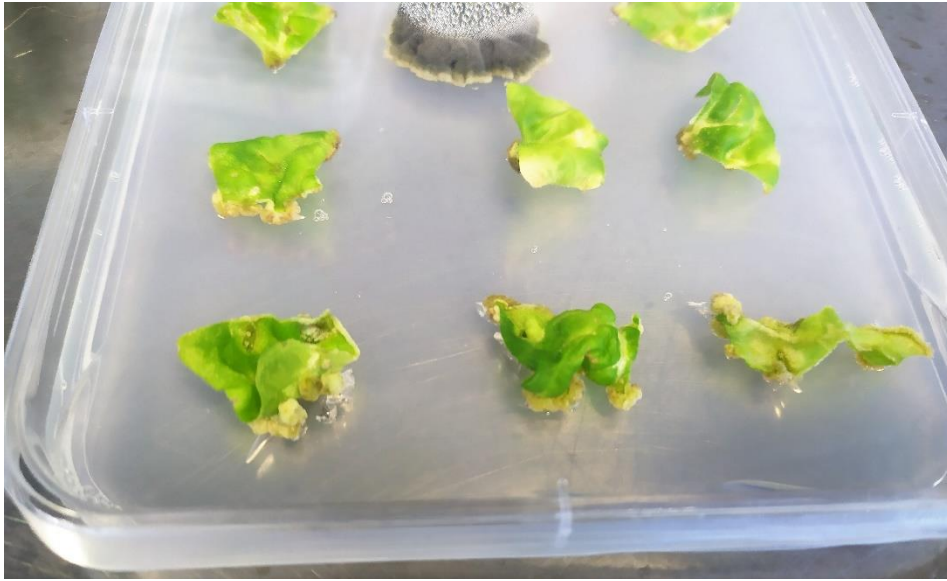


Figura 15. Placa con callos producidos en placa de N. tabacum crecidos con un fotoperiodo de luz/oscuridad con una contaminación producida por hongo.

A pesar de la contaminación, de la placa que aparece en la figura anterior se hizo un refresco de callo también en recipientes, cogiendo masas de callo de las hojas más distantes a la contaminación. Estos callos se pueden observar en la figura 16. A diferencia de las placas, los recipientes no se contaminaron y el callo pudo crecer sin problemas.

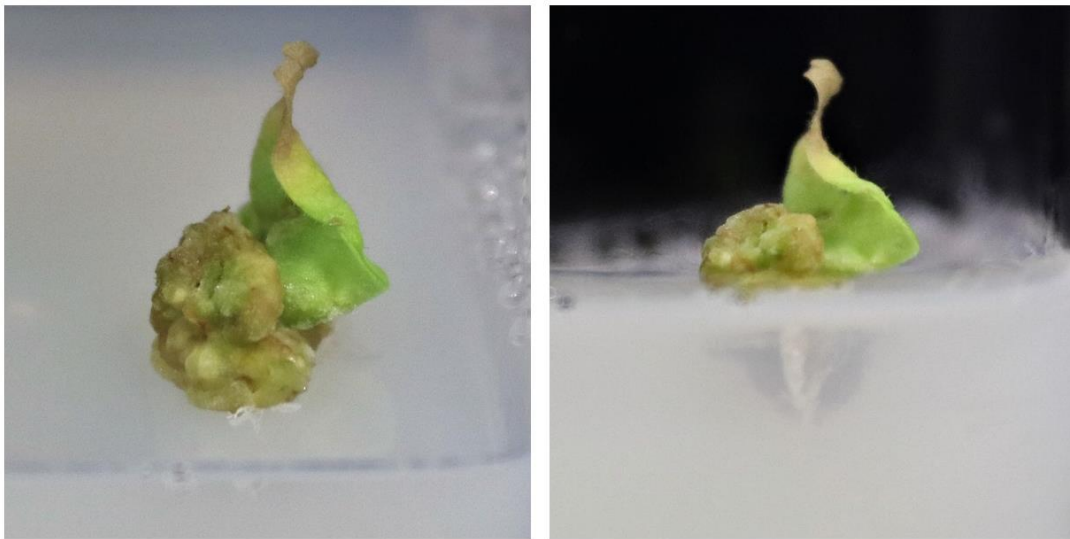


Figura 16. Imagen de un callo de N. tabacum refrescado en recipiente. El callo ha crecido internándose en el medio de cultivo sólido (derecha).

En cuanto al aspecto de los callos, el color sigue siendo algo oscuro en ciertas partes de la masa celular. Aunque la pigmentación es un poco más verdosa con respecto a los callos crecidos en placa de los que proceden, que tenían un color más amarillento. Por otro lado, al cultivarlos en recipientes, con más cantidad de medio con agar, se vio que

el callo de esta especie crece adentrándose en el medio, en vez de crecer sobre la superficie como el callo de *N. benthamiana*.

Asimismo, se repitió el proceso de producción de callo a partir de hojas de *N. tabacum* en placa, descrito al principio de este apartado. En este caso, las placas no se contaminaron y se mantuvieron en la cámara de cultivo durante 27 días.

Esta vez, se pudo apreciar una diferencia más clara en la pigmentación de los callos formados entre las placas cultivadas en oscuridad y las cultivadas en condiciones de luz/oscuridad que en las placas de *N. benthamiana*. En la figura 17 se pueden ver los callos crecidos en oscuridad. Éstos presentan un color blanco, sin pigmentación, relacionado con la falta de luz recibida.

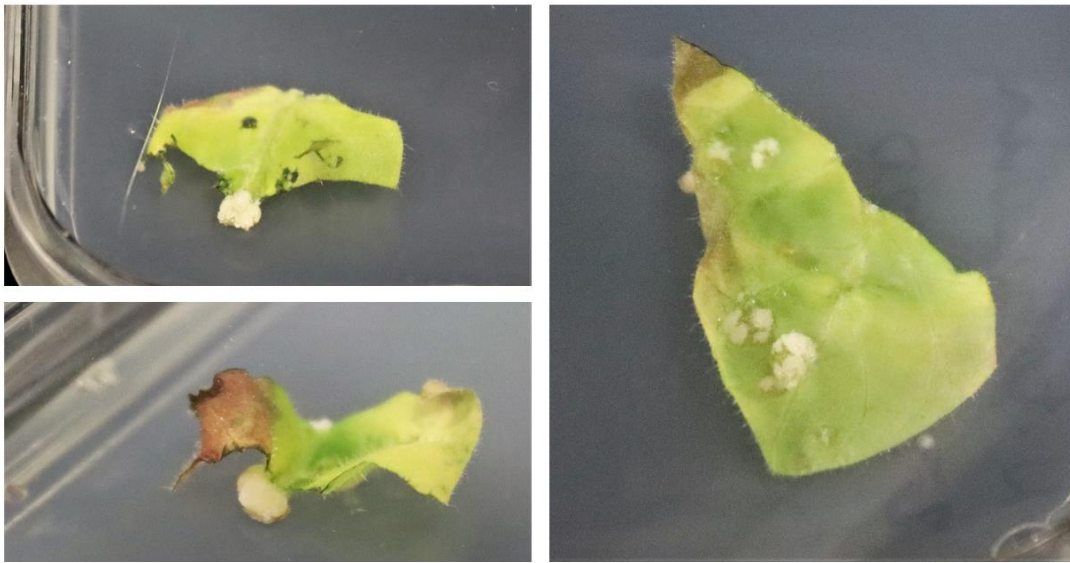


Figura 17. Imágenes de callos de *N. tabacum* producidos en placa en condiciones de oscuridad total.

Por otra parte, en la figura 18 están los callos producidos en las condiciones opuestas, los cuales presentan un color más verdoso, con algunas zonas con coloración amarilla e incluso marronácea. Estos callos se asemejan a los obtenidos en el primer ensayo de producción de callo con esta especie que se han descrito antes.

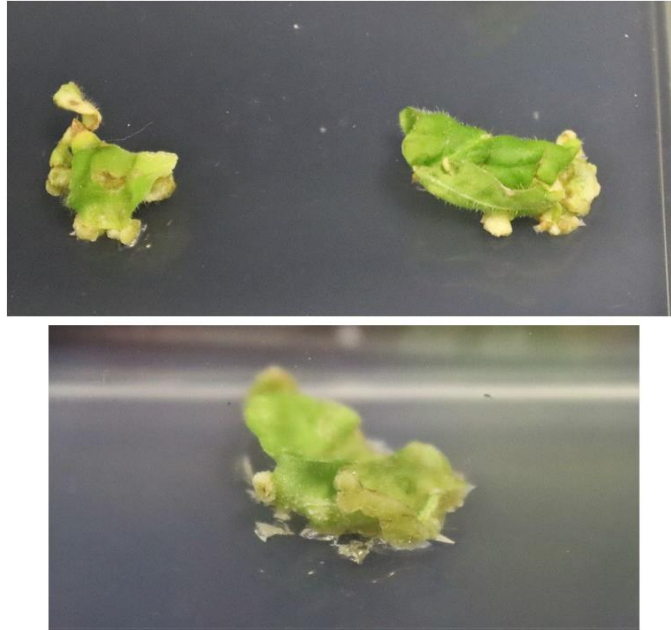


Figura 18. Imágenes de callos de *N. tabacum* crecidos en placa en condiciones de luz/oscuridad.

Viendo los resultados obtenidos, aparte de la diferencia en la coloración de las masas celulares producidas, la cantidad de biomasa producida también difiere entre las placas cultivadas en oscuridad total y aquellas que se cultivaron con un fotoperiodo de luz/oscuridad. Lo que concuerda con los resultados obtenidos en los ensayos que se realizaron por otros investigadores anteriormente.

4.3.3. Comparación directa y resumen general.

Por otra parte, al comparar los callos del refresco en recipientes de ambas especies (figura 19), se pueden ver bastante las diferencias que presentan. Por un lado, tenemos el callo de *N. tabacum*, de color oscuro, incluso con zonas de color marrón, y con un alto grado de compactación; además de que el callo creció internándose dentro del medio de cultivo sólido. Mientras que, por el contrario, el callo de *N. benthamiana* visiblemente tiene un color más claro, más verde; es menos compacto y se puede manejar mejor; la biomasa se encuentra creciendo en su totalidad en la superficie del medio de cultivo, sin penetrar en él, pero estando aun así en contacto.

La cantidad de biomasa generada también es visiblemente diferente: el callo de *N. benthamiana* es de mayor tamaño que el de *N. tabacum*. Aunque se debería determinar el peso de cada uno, así como la diferencia entre el peso inicial y el final, para ver y cuantificar la diferencia con mayor precisión.

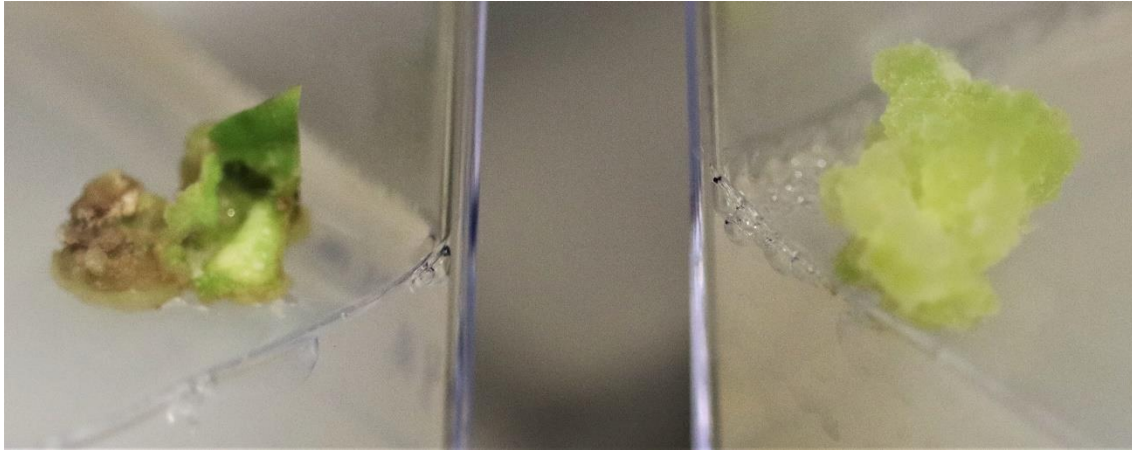


Figura 19. Imagen de un callo de *N. tabacum* (izquierda) y de un callo de *N. benthamiana* (derecha), refrescados ambos en recipientes.

En resumen, por una parte, se observó que las condiciones de luz eran un parámetro importante a tener en cuenta a la hora de producir callo en ambas especies, pero sobre todo en *N. tabacum*, ya que, aparte de la coloración diferente, se produce mayor cantidad de biomasa cuando las placas son cultivadas en condiciones de luz/oscuridad que en oscuridad total, lo que se corresponde con los resultados observados en la literatura.

Por otro lado, las condiciones de cultivo, más concretamente, la composición del medio, en cuanto al tipo de fitohormonas empleado y sus concentraciones, parecen haber sido más favorables para la especie *N. benthamiana* que para *N. tabacum*, dado que la biomasa de callo producida ha sido mayor en la primera, sobre todo en los refrescos que se cultivaron en los recipientes. Aunque para validar estos resultados haría falta realizar otros análisis más objetivos, como medir el peso de los callos antes y después de cultivarlos durante un periodo determinado de tiempo; así como tener más réplicas para poder hacer análisis estadísticos.

4.4. Cultivo celular en matraz.

Debido a los resultados obtenidos en la formación de callo, sólo se pudieron pasar a matraz los cultivos de la especie *N. benthamiana*. Se inocularon 4 matraces, pero los callos no eran friables, por lo que no se llegaron a disgregar bien.

Los matraces se dispusieron uno en cada esquina del incubador, como se puede ver en el esquema de la figura 20. Dos de ellos recibían el calor de forma directa, mientras que los otros dos no. Además, dos matraces recibían más luz que los otros dos. Dentro del incubador se genera un gradiente de temperatura, siendo ésta de 28 grados en el extremo donde se genera calor para mantener la temperatura constante, y de 26 en el extremo opuesto.

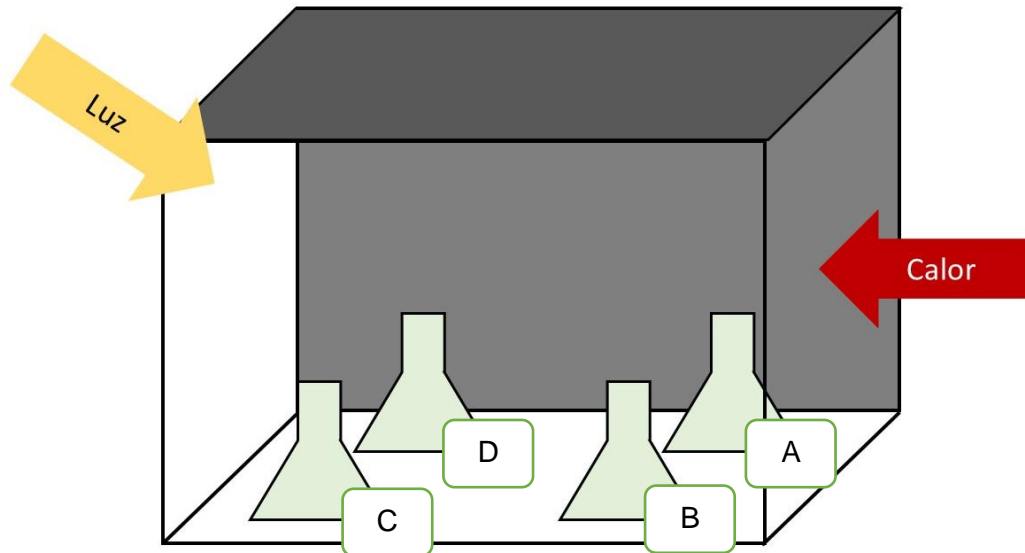


Figura 20. Representación gráfica del incubador empleado para realizar los ensayos. Los matraces están etiquetados con letras (A-D) correspondientes al etiquetado que se empleó en el ensayo. Las fuentes de calor y luz están representadas con flechas, señalando la dirección con las que incidían. Las zonas representadas en gris equivalen a paredes opacas del incubador que no dejaban pasar la luz.

Este gradiente afectó al crecimiento del cultivo celular, ya que los matraces que estaban en el extremo opuesto, a menor temperatura, no crecieron nada e incluso perdieron la pigmentación (Figura 21 C-D). Por otra parte, los dos matraces que recibían el calor de forma directa tuvieron un mayor crecimiento, y los agregados celulares mantuvieron la pigmentación (Figura 21 A-B). Entre estos dos también se apreció un poco de diferencia en el crecimiento, que podría deberse a la exposición a la luz, no recibían la misma cantidad de luz en las posiciones en las que se encontraban dentro del incubador.

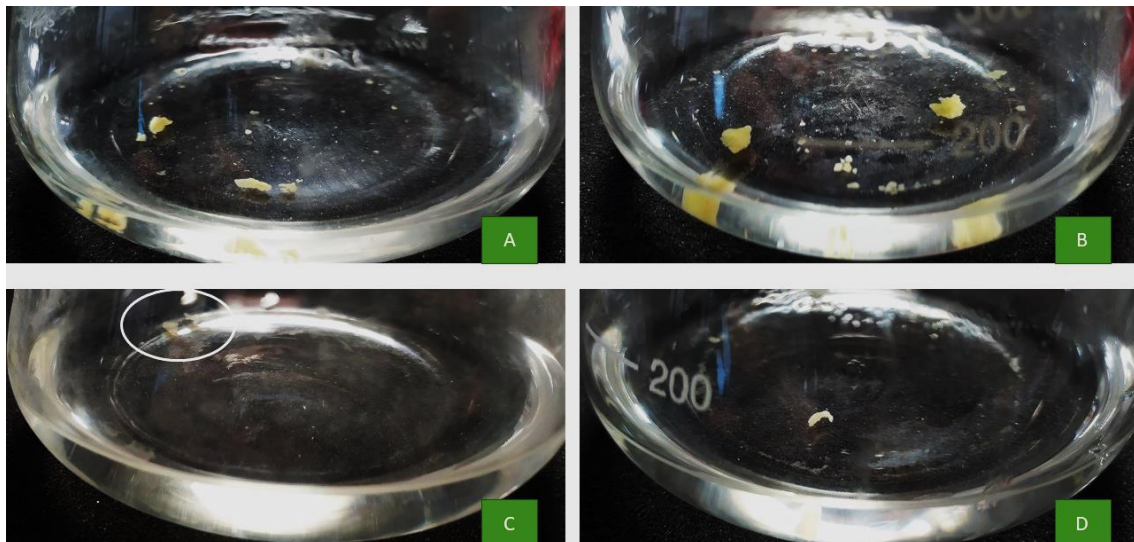


Figura 21. Imágenes de los matraces donde se cultivaron las células vegetales a los _ días de la inoculación. A,B son los matraces situados cerca de la fuente de calor: A en la zona expuesta a menos luz, B en la zona que recibía más cantidad de luz. C,D se corresponden con los matraces situados en el lado opuesto de la fuente de calor: C recibía más luz, D estaba en la zona más oscura del incubador.

En este experimento no se pudo medir la densidad óptica, ya que las masas de células no se disgregaron correctamente y, por tanto, la medida no iba a ser fiable. Tampoco se

pudo hacer un seguimiento del peso de los matraces de forma continua. Aun así, se llegó a apreciar un aumento en la biomasa de los matraces A y B, que fueron los que tenían las condiciones de cultivo óptimas de temperatura. Para aumentar la disgregación de las células se podría emplear algún compuesto para degradar las paredes celulares y así llegar a tener un cultivo celular más homogéneo, sin agregados celulares; o bien inocular los matraces con callo que fuese friable.

Cuando se obtuvieron callos de *N. tabacum* que se consideraron viables para continuar con el proceso del cultivo in vitro, se repitió el paso de masas de callo a matraz con medio líquido, esta vez, con cultivos de las dos especies. Teniendo en cuenta la configuración y morfología del incubador, se decidió poner dos matraces de cada especie, uno de ellos cerca de la fuente de calor, y otro en el otro extremo. Se tomó esta decisión debido a que la mayor diferencia en el crecimiento que se apreció en el anterior experimento fue a causa de la diferencia en la temperatura. Los matraces determinados como "1" estaban en el extremo opuesto de la fuente de calor, y los determinados como "2" eran los que recibían de forma directa el calor. Añadir que los matraces de *N. tabacum* se dispusieron en la zona delantera que, según los resultados obtenidos anteriormente, recibía mayor cantidad de luz ambiental. Aunque se modificó la arquitectura del incubador para que, teóricamente, todos los matraces recibieran la misma cantidad de luz.

En este caso, los callos se disgregaron mejor que en el anterior experimento, aunque no fue una disgregación completa y total, como se aprecia en la figura 22. Como los callos de *N. benthamiana* estaban menos compactados y se podían manipular mejor, se disgregaron más que en el caso de *N. tabacum* cuando se pasaron a medio líquido. Los agregados de *N. tabacum* tenían un color más oscuro, como los callos de los que proceden. Mientras que los de *N. benthamiana* presentaban una coloración más verde y clara, también parecida a la del callo con el que se inocularon los matraces.

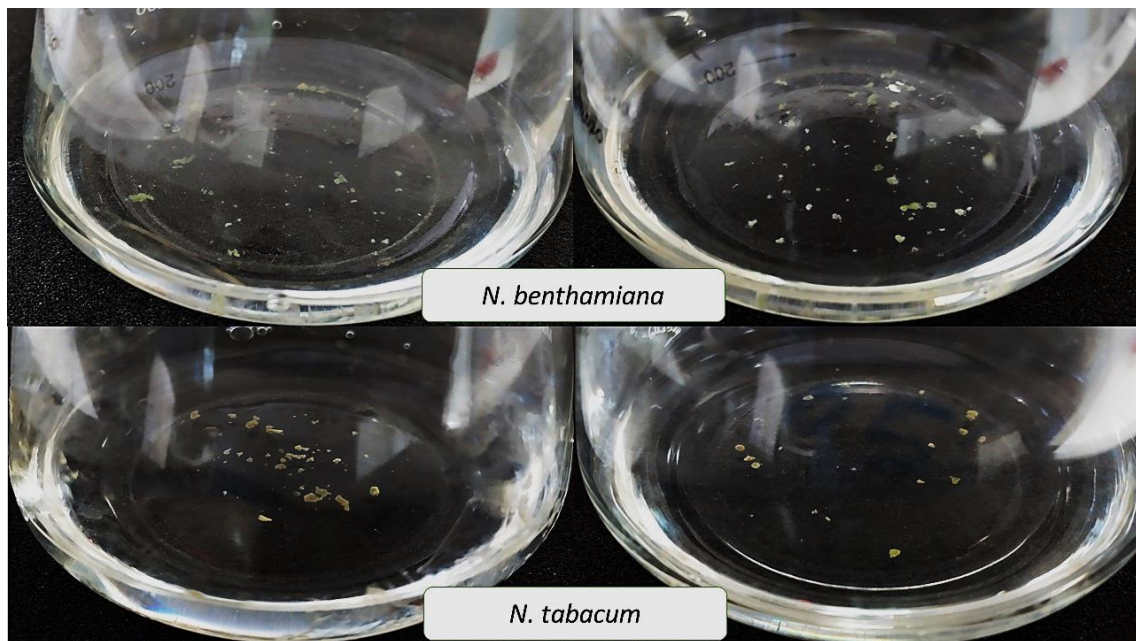


Figura 22. Imagen de los matraces empleados para el cultivo de las células vegetales justo después de la inoculación.

Tras 5 días de cultivo en el incubador se observó que un matraz de cada una de las especies se había contaminado por hongos, pero se siguieron manteniendo hasta el final del ensayo. El peso de los matraces decreció en comparación con el peso inicial. Aunque la disminución no era muy significativa debido a que la balanza no tenía mucha precisión. La biomasa aumentó ligeramente, aunque sólo se obtuvieron resultados visibles. La coloración de los agregados de *N. tabacum* adquirió un tono más marrón. Mientras tanto, los agregados de *N. benthamiana* seguían siendo de color verde claro. Los matraces se muestran en la figura 23.

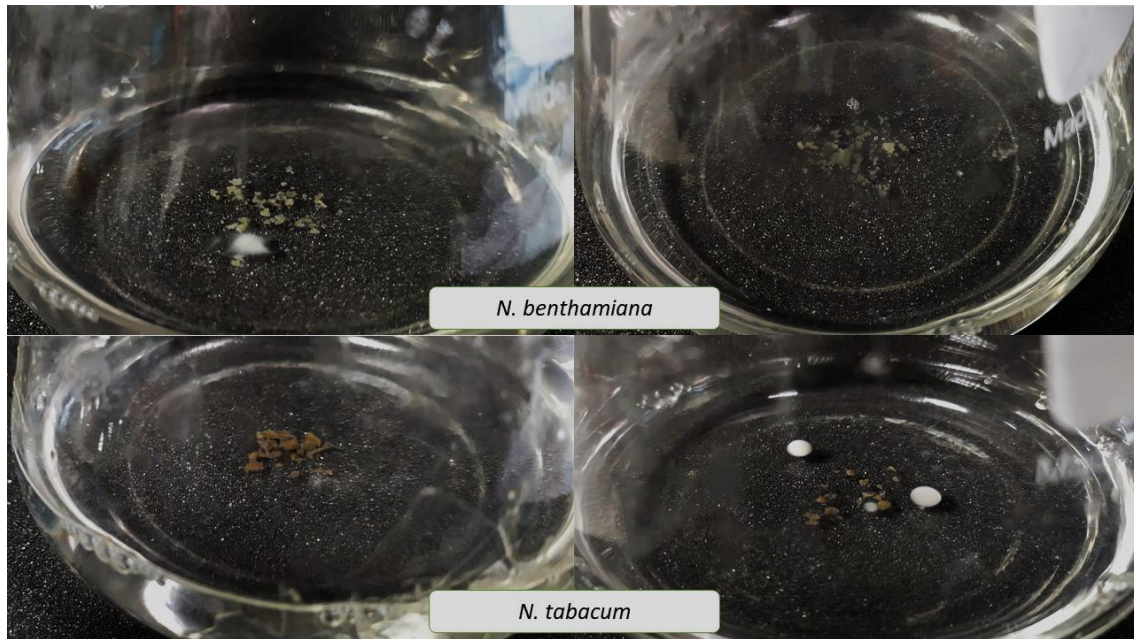


Figura 23. Imagen de los matraces empleados en el cultivo celular, tras 5 días de cultivo en el incubador.

El aspecto de los matraces una semana después se puede ver en la figura 24. Las contaminaciones siguieron creciendo en los matraces, inhibiendo el crecimiento de las células vegetales; los otros dos matraces no se llegaron a contaminar. Con respecto a la biomasa, se pudo apreciar un ligero aumento en comparación con la cantidad de biomasa de la semana anterior, aunque este aumento sólo se pudo cuantificar de forma visible. El aspecto de los agregados seguía siendo el mismo: por un lado, los agregados de *N. tabacum* tenían la misma coloración oscura, mientras que el color de los agregados de *N. benthamiana* tenía una tonalidad verde clara, algunos de ellos llegando a ser casi blancos. El peso de los matraces seguía decreciendo, pero la diferencia era casi inapreciable, debido a la precisión de la balanza, como se mencionó anteriormente.

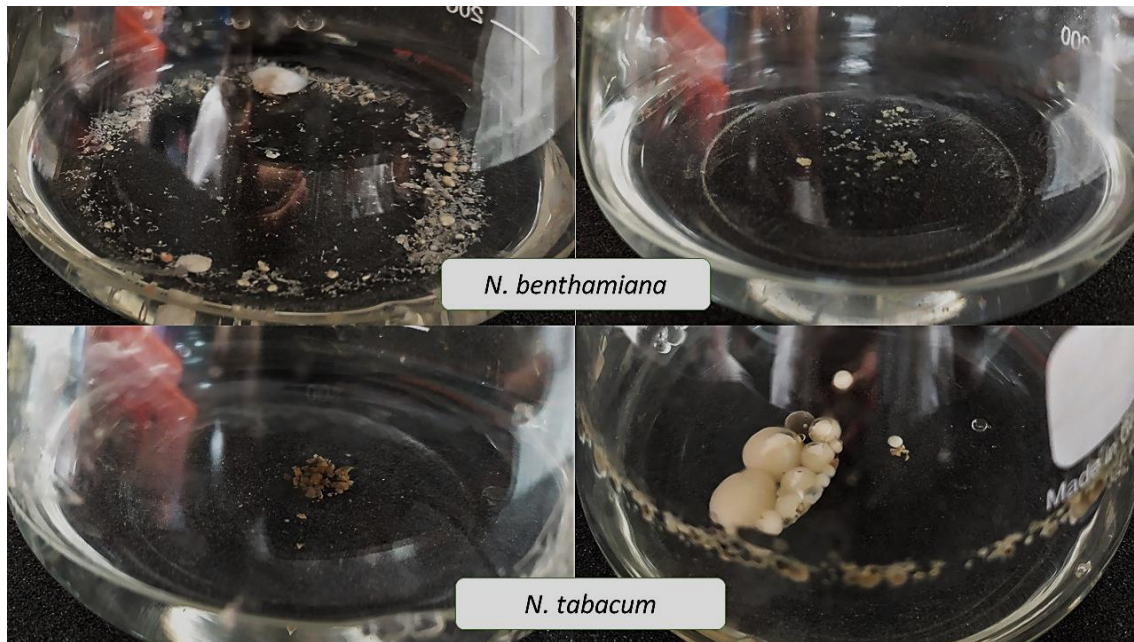


Figura 24. Imagen de los matraces empleados en el cultivo celular, tras 12 días de cultivo.

Según la literatura, los cultivos celulares de líneas transgénicas en medio líquido de *N. benthamiana* tienen su pico más alto de crecimiento sobre los 18 días de cultivo (Sukenik et al. 2018). Por otra parte, otros estudios realizados con líneas de *N. tabacum* realizaban los subcultivos a los siete días (Dean, Mohammed, y Fitzpatrick 2005; van Gulik, ten Hoopen, y Heijnen 1992; Negrel y Javelle 2010) cuando, en teoría, los cultivos estarían en fase exponencial de crecimiento o en su máximo. Se decidió dejar los cultivos un tiempo que estuviese entre esos dos rangos, que fueron al final 12 días.

Sin embargo, tras ver los resultados obtenidos, habría sido mejor seguir con los cultivos en el incubador durante más días, para ver si la producción de biomasa pudiese alcanzar niveles más altos. Por ejemplo, en el primer ensayo que se hizo sólo con *N. benthamiana*, la biomasa siguió aumentando después de estos 12 días. Además de que las condiciones de cultivo empleadas no están optimizadas, y el crecimiento podría estar siendo más lento de lo constatado en la literatura.

En la figura 25 aparece una gráfica donde se exponen los pesos de cada matraz. Los pesos aparecen en el eje Y, mientras que las fechas en las que se realizaron las mediciones aparecen en el eje X. Cada matraz está representado con un color y un símbolo, como aparece en la leyenda de la gráfica. Con el paso de los días se observa que los pesos de los matraces van decreciendo, a pesar de que la biomasa dentro de ellos aumenta, bien por las células vegetales o por las contaminaciones fúngicas. Teniendo en cuenta estos resultados, se podría afirmar que este método no es el adecuado para la determinación de la formación de biomasa. Se debería recurrir a métodos más invasivos, como la determinación del peso seco. En ese caso, sería adecuado tener un mayor número de réplicas, aunque éstas fuesen de menor tamaño. De esta forma, se podrían tomar medidas cada cierto tiempo y hacer una curva que se pudiese emplear como modelo

para futuros proyectos. Esta curva se podría correlacionar con una curva de densidad óptica, la cual también se podría emplear como modelo.

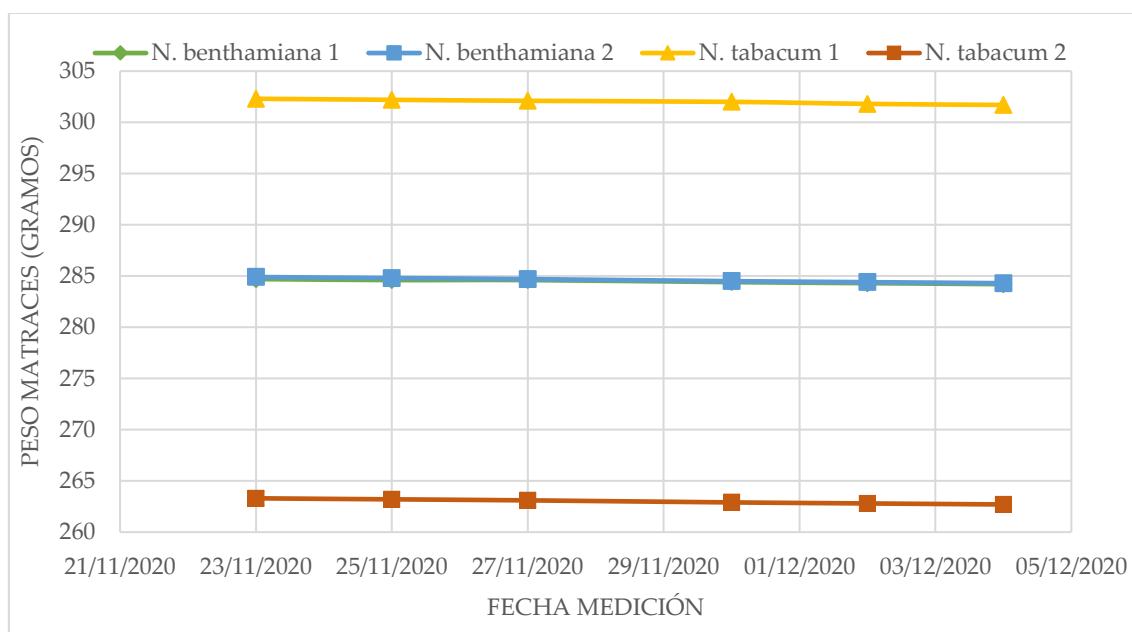


Figura 25. Gráfica con los pesos de los matraces en cada fecha de medición.

En cuanto a la densidad óptica, como sólo se consideró medirla al final del ensayo, para evitar que hubiese más contaminaciones, ya que el cultivo de los matraces se hizo en las instalaciones de BIONET, donde se realizan cultivos de microorganismos (bacterias, hongos, levaduras). Aunque los callos eran más friables que en el ensayo anterior, las masas de células no se llegaron a disgregar del todo y quedaron aun así agregados celulares, por lo cual, la densidad óptica tampoco se estimó como un parámetro fiable. Los valores obtenidos se encuentran en la Tabla 5.

Tabla 4. Densidad óptica medida a una longitud de onda de 600nm de cada matraz.

	<i>N. benthamiana</i>		<i>N. tabacum</i>	
	1	2	1	2
OD600	Contaminado	0.03	0.04	Contaminado

5. Conclusiones

Tras analizar exhaustivamente los resultados obtenidos de los ensayos realizados, se puede concluir que:

1. El protocolo seguido para el establecimiento del cultivo in vitro fue el adecuado para ambas especies.
2. Se ha conseguido establecer cultivos in vitro de *N. benthamiana* y de *N. tabacum*, llegando hasta el cultivo de células en medio líquido, aunque el paso de callo a cultivo líquido no se ha conseguido optimizar para tener un cultivo totalmente homogéneo sin agregados celulares de gran tamaño.

3. Las plantas producidas en condiciones in vitro tenían aspecto saludable en ambos casos y las diferencias observadas entre las diferentes especies (color de la planta, número y tamaño de las hojas) se atribuyen a diferencias relacionadas con el fenotipo propio de cada especie, y no a que las condiciones de cultivo hayan propiciado dichas diferencias.
4. Las plántulas de *N. benthamiana* fueron capaces de producir flores, aunque éstas no llegaban a su completo desarrollo, mientras que ninguna de las plántulas de *N. tabacum* presentó flores.
5. En algunas plantas de la especie *N. benthamiana* aparecieron meristemoides ectópicos. Este fenómeno podría estar relacionado con una mutación o condiciones de cultivo que alteren la expresión del gen *anantha*. Tras hacer un análisis mediante BLAST se han encontrado tres copias de este gen en el genoma de *N. benthamiana*, lo que indica que al menos uno de los tres debería mostrar expresión diferencial.
6. Las condiciones de luz afectan a la producción de callo: en *N. benthamiana* los callos tenían diferente coloración. Eran verdes en condiciones de luz/oscuridad y blancos en condiciones de oscuridad total. En *N. tabacum*, aparte de que los callos diferían en el color, la cantidad de biomasa generada también fue desigual. Así, en los callos cultivados con luz fue mayor que en los callos cultivados en oscuridad total.
7. Las condiciones de cultivo, sobre todo la composición del medio, resultaron ser mejores para *N. benthamiana* que para *N. tabacum* en el proceso de inducción de callo. La primera produjo más cantidad de biomasa y con mejor aspecto, además de que sus callos eran más friables y su nivel de compactación era menor.
8. Los callos de *N. tabacum* crecieron de forma diferente a los de *N. benthamiana*: la masa celular se adentraba en el medio de cultivo en vez de crecer sobre la superficie.
9. En ambas especies, el refresco de los callos en recipientes fue mejor que el cultivo en placas, ya que la biomasa producida fue mayor. Además, en el caso de *N. benthamiana* los callos eran más friables.
10. Se ha observado que la temperatura es un parámetro clave para el cultivo de células vegetales en medio líquido. Una diferencia de temperatura de $\pm 2^{\circ}\text{C}$ puede llegar a suponer la inhibición o no del crecimiento, como se ha demostrado con el primer ensayo que se ha realizado con el cultivo de células de *N. benthamiana*.
11. Los parámetros empleados para el seguimiento del crecimiento de las células en el cultivo en medio líquido no fueron los adecuados.
12. No se han apreciado diferencias significativas en cuanto a la velocidad de crecimiento y la cantidad de biomasa producida en el cultivo in vitro de estas dos especies vegetales. Más concretamente en los pasos desde la germinación de las semillas hasta el desarrollo de las plantas completas.
13. En la producción e inducción de callo se han observado ciertas diferencias relacionadas con la producción de biomasa entre *N. benthamiana* y *N. tabacum*.

Estas diferencias también se han podido apreciar en el crecimiento en medio líquido.

14. Sería aconsejable realizar una mayor cantidad de réplicas en los experimentos para poder hacer un análisis estadístico y respaldar con él los resultados que se obtengan.
15. Se deberían establecer parámetros objetivos para medir el crecimiento y el desarrollo de los cultivos. Por ejemplo, la altura de las plantas, el tamaño de la raíz o de los cotiledones de las semillas germinadas, peso de las masas de callo producidas. De esta forma, se podrían analizar y comparar los resultados de una forma más objetiva.

6. Agradecimientos

Este trabajo se ha desarrollado dentro de la Cátedra BIONET.

7. Bibliografía

- Altschul, Stephen F., Warren Gish, Webb Miller, Eugene W. Myers, y David J. Lipman. 1990. «Basic Local Alignment Search Tool». *Journal of Molecular Biology* 215 (3): 403-10. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- Aoki, S., y M. Ito. 2000. «Molecular Phylogeny of Nicotiana (Solanaceae) Based on the Nucleotide Sequence of the MatK Gene». *Plant Biology* 2 (3): 316-24. <https://doi.org/10.1055/s-2000-3710>.
- Bolaños-Martínez, Omayra C., y Sergio Rosales-Mendoza. 2020. «The Potential of Plant-Made Vaccines to Fight Picornavirus». *Expert Review of Vaccines* 19 (7): 599-610. <https://doi.org/10.1080/14760584.2020.1791090>.
- Budzianowska, Anna. 2009. «[In vitro cultures of tobacco and their impact on development of plant biotechnology]». *Przegląd Lekarski* 66 (10): 890-93.
- Castresana, J. 2000. «Selection of Conserved Blocks from Multiple Alignments for Their Use in Phylogenetic Analysis». *Molecular Biology and Evolution* 17 (4): 540-52. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334>.
- Chevenet, François, Christine Brun, Anne-Laure Bañuls, Bernard Jacq, y Richard Christen. 2006. «TreeDyn: Towards Dynamic Graphics and Annotations for Analyses of Trees». *BMC Bioinformatics* 7 (1): 439. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-439>.
- Dean, John V., Leila A. Mohammed, y Terry Fitzpatrick. 2005. «The Formation, Vacuolar Localization, and Tonoplast Transport of Salicylic Acid Glucose Conjugates in Tobacco Cell Suspension Cultures». *Planta* 221 (2): 287-96. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1430-3>.
- Dereeper, A., V. Guignon, G. Blanc, S. Audic, S. Buffet, F. Chevenet, J.-F. Dufayard, et al. 2008. «Phylogeny.Fr: Robust Phylogenetic Analysis for the Non-Specialist». *Nucleic Acids Research* 36 (Web Server): W465-69. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn180>.
- Edgar, Robert C. 2004a. «MUSCLE: Multiple Sequence Alignment with High Accuracy and High Throughput». *Nucleic Acids Research* 32 (5): 1792-97. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>.

- — —. 2004b. «MUSCLE: A Multiple Sequence Alignment Method with Reduced Time and Space Complexity». *BMC Bioinformatics* 5 (agosto): 113. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-113>.
- Fernandez-Pozo, Noe, Naama Menda, Jeremy D. Edwards, Surya Saha, Isaak Y. Tecle, Susan R. Strickler, Aureliano Bombarely, et al. 2015. «The Sol Genomics Network (SGN)—from Genotype to Phenotype to Breeding». *Nucleic Acids Research* 43 (D1): D1036-41. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1195>.
- Godoy-Hernández, Gregorio, y Felipe A. Vázquez-Flota. 2005. «Growth Measurements: Estimation of Cell Division and Cell Expansion». En *Plant Cell Culture Protocols*, de Víctor M. Loyola-Vargas y Felipe Vázquez-Flota, 0:051-058. New Jersey: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-959-1:051>.
- Gomes, Marinna, Maria Alejandra Alvarez, Leonardo Ramos Quellis, Melina Lagua Becher, Juciane Maria de Andrade Castro, Jacy Gameiro, Maria Cristina Caporrino, Ana Maria Moura-da-Silva, y Marcelo de Oliveira Santos. 2019. «Expression of an ScFv Antibody Fragment in *Nicotiana Benthamiana* and in Vitro Assessment of Its Neutralizing Potential against the Snake Venom Metalloproteinase BaP1 from *Bothrops Asper*». *Toxicon* 160 (marzo): 38-46. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.02.011>.
- Goodin, Michael M., David Zaitlin, Rayapati A. Naidu, y Steven A. Lommel. 2008. «*Nicotiana Benthamiana* : Its History and Future as a Model for Plant–Pathogen Interactions». *Molecular Plant-Microbe Interactions*® 21 (8): 1015-26. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-8-1015>.
- Goodstein, David M., Shengqiang Shu, Russell Howson, Rochak Neupane, Richard D. Hayes, Joni Fazo, Therese Mitros, et al. 2012. «Phytozome: A Comparative Platform for Green Plant Genomics». *Nucleic Acids Research* 40 (D1): D1178-86. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr944>.
- Guindon, Stéphane, Jean-François Dufayard, Vincent Lefort, Maria Anisimova, Wim Hordijk, y Olivier Gascuel. 2010. «New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0». *Systematic Biology* 59 (3): 307-21. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>.
- Gulik, W. M. van, H. J. G. ten Hoopen, y J. J. Heijnen. 1992. «Kinetics and Stoichiometry of Growth of Plant Cell Cultures Of *Catharanthus Roseus* And *Nicotiana Tabacum* in Batch and Continuous Fermentors». *Biotechnology and Bioengineering* 40 (8): 863-74. <https://doi.org/10.1002/bit.260400802>.
- Ho, Chung-Han, Kelley A. Henderson, y Gregory L. Rorrer. 1995. «Cell damage and oxygen mass transfer during cultivation of *Nicotiana tabacum* in a stirred-tank bioreactor». *Biotechnology progress* 11 (2): 140–145.
- Hoekema, A., P. R. Hirsch, P. J. J. Hooykaas, y R. A. Schilperoort. 1983. «A Binary Plant Vector Strategy Based on Separation of Vir- and T-Region of the *Agrobacterium Tumefaciens* Ti-Plasmid». *Nature* 303 (5913): 179-80. <https://doi.org/10.1038/303179a0>.
- Huang, Ting-Kuo, y Karen A. McDonald. 2012. «Bioreactor Systems for in Vitro Production of Foreign Proteins Using Plant Cell Cultures». *Biotechnology Advances* 30 (2): 398-409. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.07.016>.
- Huang, Ting-Kuo, Michael A. Plesha, Bryce W. Falk, Abhaya M. Dandekar, y Karen A. McDonald. 2009. «Bioreactor Strategies for Improving Production Yield and Functionality of a Recombinant Human Protein in Transgenic Tobacco Cell

- Cultures». *Biotechnology and Bioengineering* 102 (2): 508-20.
<https://doi.org/10.1002/bit.22061>.
- Huxter, Terry J., David M. Reid, y Trevor A. Thorpe. 1979. «Ethylene Production by Tobacco (*Nicotiana Tabacum*) Callus». *Physiologia Plantarum* 46 (4): 374-80.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1979.tb02635.x>.
- Larkin, M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, et al. 2007. «Clustal W and Clustal X Version 2.0». *Bioinformatics* 23 (21): 2947-48. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>.
- Lee, Sang-Yoon, y Dong-II Kim. 2006. «Perfusion cultivation of transgenic *Nicotiana tabacum* suspensions in bioreactor for recombinant protein production». *Journal of microbiology and biotechnology* 16 (5): 673–677.
- Lee, Sang-Yoon, Yong-Hoon Kim, Yun-Sook Roh, Hyun-Jong Myoung, Ki-Yong Lee, y Dong-II Kim. 2004. «Bioreactor operation for transgenic *Nicotiana tabacum* cell cultures and continuous production of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by perfusion culture». *Enzyme and microbial technology* 35 (6-7): 663–671.
- Li, Jin, Thomas J. Stoddard, Zachary L. Demorest, Pierre-Olivier Lavoie, Song Luo, Benjamin M. Clasen, Frederic Cedrone, Erin E. Ray, Andrew P. Coffman, y Aurelie Daulhac. 2016. «Multiplexed, targeted gene editing in *Nicotiana benthamiana* for glyco-engineering and monoclonal antibody production». *Plant biotechnology journal* 14 (2): 533–542.
- Lippman, Zachary B, Oded Cohen, John P Alvarez, Mohamad Abu-Abied, Irena Pekker, Ilan Paran, Yuval Eshed, y Dani Zamir. 2008. «The Making of a Compound Inflorescence in Tomato and Related Nightshades». Editado por Detlef Weigel. *PLoS Biology* 6 (11): e288.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060288>.
- NCBI Resource Coordinators, Richa Agarwala, Tanya Barrett, Jeff Beck, Dennis A Benson, Colleen Bollin, Evan Bolton, et al. 2018. «Database Resources of the National Center for Biotechnology Information». *Nucleic Acids Research* 46 (D1): D8-13. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1095>.
- Negrel, Jonathan, y Francine Javelle. 2010. «The Biosynthesis of Acetovanillone in Tobacco Cell-Suspension Cultures». *Phytochemistry* 71 (7): 751-59.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.01.011>.
- Nekrasov, Vladimir, Brian Staskawicz, Detlef Weigel, Jonathan D G Jones, y Sophien Kamoun. 2013. «Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease». *Nature Biotechnology* 31 (8): 691-93. <https://doi.org/10.1038/nbt.2655>.
- Phoolcharoen, Waranyoo, Seong H. Bhoo, Huafang Lai, Julian Ma, Charles J. Arntzen, Qiang Chen, y Hugh S. Mason. 2011. «Expression of an immunogenic Ebola immune complex in *Nicotiana benthamiana*». *Plant biotechnology journal* 9 (7): 807–816.
- Pombo, Marina A., Hernan G. Rosli, Noe Fernandez-Pozo, y Aureliano Bombarely. 2020. «*Nicotiana Benthamiana*, A Popular Model for Genome Evolution and Plant–Pathogen Interactions». En *The Tobacco Plant Genome*, editado por Nikolai V. Ivanov, Nicolas Sierro, y Manuel C. Peitsch, 231-47. Compendium of Plant Genomes. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-29493-9_14.

- Risseeuw, Eddy, Prakash Venglat, Daoquan Xiang, Kristina Komendant, Tim Daskalchuk, Vivijan Babic, William Crosby, y Raju Datla. 2013. «An Activated Form of UFO Alters Leaf Development and Produces Ectopic Floral and Inflorescence Meristems». Editado por David E. Somers. *PLoS ONE* 8 (12): e83807. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083807>.
- Seibert, Michael, Phyllis J. Wetherbee, y Donald D. Job. 1975. «The Effects of Light Intensity and Spectral Quality on Growth and Shoot Initiation in Tobacco Callus». *Plant Physiology* 56 (1): 130-39. <https://doi.org/10.1104/pp.56.1.130>.
- Shibasaki, Naomi, Kenji Hirose, Toshikuni Yonemoto, y Teiriki Tadaki. 1992. «Suspension culture of *Nicotiana tabacum* cells in a rotary-drum bioreactor». *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 53 (4): 359–363.
- Siddique, Abu Baker, y SM Shahinul Islam. 2018. «Effect of light and dark on callus induction and regeneration in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)». *Bangladesh Journal of Botany* 44 (4): 643-51. <https://doi.org/10.3329/bjb.v44i4.38636>.
- Sievers, Fabian, Andreas Wilm, David Dineen, Toby J Gibson, Kevin Karplus, Weizhong Li, Rodrigo Lopez, et al. 2011. «Fast, Scalable Generation of High-quality Protein Multiple Sequence Alignments Using Clustal Omega». *Molecular Systems Biology* 7 (1): 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>.
- Sorrell, David A., Bruno Combettes, Nicole Chaubet-Gigot, Claude Gigot, y James AH Murray. 1999. «Distinct cyclin D genes show mitotic accumulation or constant levels of transcripts in tobacco bright yellow-2 cells». *Plant Physiology* 119 (1): 343–352.
- Strasser, Richard, Johannes Stadlmann, Matthias Schähns, Gabriela Stiegler, Heribert Quendler, Lukas Mach, Josef Glössl, Koen Weterings, Martin Pabst, y Herta Steinkellner. 2008. «Generation of glyco-engineered *Nicotiana benthamiana* for the production of monoclonal antibodies with a homogeneous human-like N-glycan structure». *Plant biotechnology journal* 6 (4): 392–402.
- Sukenik, Sara, Kalimuthu Karuppanan, Qiongyu Li, Carlito Lebrilla, Somen Nandi, y Karen McDonald. 2018. «Transient Recombinant Protein Production in Glycoengineered *Nicotiana Benthamiana* Cell Suspension Culture». *International Journal of Molecular Sciences* 19 (4): 1205. <https://doi.org/10.3390/ijms19041205>.
- Vasil, V., y A. C. Hildebrandt. 1965. «Differentiation of Tobacco Plants from Single, Isolated Cells in Microcultures». *Science (New York, N.Y.)* 150 (3698): 889-92. <https://doi.org/10.1126/science.150.3698.889>.
- Zhong, Jian-Jiang. 2001. «Biochemical Engineering of the Production of Plant-Specific Secondary Metabolites by Cell Suspension Cultures». En *Plant Cells*, editado por J. -J. Zhong, S. Y. Byun, G. H. Cho, J. W. Choi, J. R. Haigh, H. Honda, E. James, et al., 1-26. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/3-540-45302-4_1.