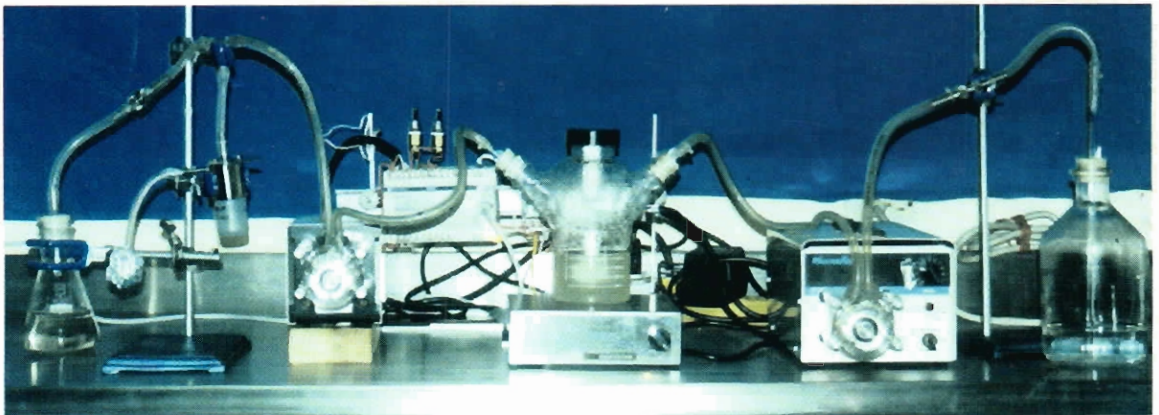


MAESTRÍA EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

CULTIVO SEMICONTINUO DE SUSPENSIONES CELULARES DE *Coffea arabica* var. Caturra.



Lorena Isabel Vega Merino

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN A.C

UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

CULTIVO SEMICONTINUO DE SUSPENSIONES CELULARES DE
Coffea arabica var. Caturra.

TESIS QUE PRESENTA

I.B.Q. LORENA ISABEL VEGA MERINO

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS Y
BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2001

A mis padres con cariño y agradecimiento por todo su apoyo.

A mi hijo Luis Mario, el motor que mueve mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación Científica de Yucatán, en la Unidad de Biotecnología, bajo la dirección del Dr. Felipe Barahona Pérez a quien agradezco la oportunidad y la confianza para realizar este trabajo, así como su apoyo y disponibilidad para compartir sus conocimientos.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) la beca crédito otorgada para realizar los estudios de maestría en este Centro (Número de registro 116918).

Este trabajo fue revisado por la Dra. Nancy Santana Buzzy, la M.C. Marcela Zamudio Mayo, el Dr. Enrique Sauri Duch y el M.C. Javier Mijangos Cortez, a quienes agradezco sus recomendaciones y comentarios realizados, los cuales enriquecieron el contenido de este trabajo.

Al Dr. Armado Cahue López agradezco de manera muy especial sus asesorías.

A Mario Montoya Martínez agradezco el apoyo brindado al realizar el programa que controla el equipo de cultivo semicontinuo.

Contenido

Resumen	1
Abstract	3
Introducción	5
Capítulo I Antecedentes	7
Importancia Económica del Cafeto.	7
Taxonomía del Cafeto.	8
Propagación del Cafeto.	9
Cultivo <i>In Vitro</i> del Cafeto.	9
Bibliografía.	15
Capítulo II Suspensiones Celulares de Plantas.	19
Características de las Suspensiones.	19
Embriogénesis Somática.	20
Suspensiones Homogéneas de Células Meristemáticas.	25
Bibliografía.	26
Capítulo III Cultivo Continuo.	31
Introducción al Cultivo Continuo.	31
Teoría del Cultivo Continuo.	32
Clasificación del Cultivo Continuo.	34
Aplicaciones del Cultivo Continuo.	36
Bibliografía.	39
Capítulo IV Materiales y Métodos.	43
Obtención de la Suspensión Celular.	45
Parámetros de Crecimiento.	46
Determinación Cualitativa del Consumo de Azúcares.	48
Diseño y Establecimiento del Sistema de Cultivo Semicontinuo.	49
Bibliografía.	51
Capítulo V Resultados y Discusiones.	53
Cinética de Crecimiento en Matraz.	53
Características de la Suspensión de <i>C. arábica</i> .	63
Cultivo Semicontinuo de Suspensiones Celulares de <i>C. arábica</i> .	65
Bibliografía.	78
Capítulo VI Conclusiones Perspectivas.	81

Lista de cuadros

Cuadro 2.1. Suspensiones celulares de diferentes especies, en las que se ha realizado una clasificación de las células como embriogénicas y no embriogénicas en función a su morfología.

Cuadro 4.1. Características de los estándares utilizados en cromatografía de capa fina para el análisis semicuantitativo de azúcares.

Lista de figuras

Figura 3.1. Esquema de un sistema de cultivo continuo.

Figura 3.2. Comportamiento de la producción de biomasa X y de la concentración de sustrato limitante S, en un cultivo continuo.

Figura 4.1. Sistema de cultivo semicontinuo.

Figura 5.1. Análisis cualitativo del consumo de sacarosa, fructosa y glucosa, de una suspensión de *C. arabica*, por cromatografía en capa fina.

Figura 5.2. Variación del pH en suspensiones celulares de *C. arabica* en fase de multiplicación en matraces.

Figura 5.3. Variación del peso fresco y del peso seco de suspensiones celulares de *C. arabica* en un ciclo de cultivo de 30 días.

Figura 5.4. Variación del volumen de paquete celular con respecto al tiempo de suspensiones celulares de *C. arabica* en un ciclo de cultivo de 30 días.

Figura 5.5. Variación de la conductividad con respecto al tiempo de suspensiones celulares de *C. arabica* en fase de multiplicación.

Figura 5.6. Variación de la osmolaridad con respecto al tiempo de suspensiones celulares de *C. arabica* en fase de multiplicación.

Figura 5.7. Células en suspensión de *C. arabica* teñidas con FDA: a) tipo 1, b) tipo 2, c) tipo 3 y d) tipo 4 (escala de la barra : 10 μm).

Figura 5.8. Numero de células totales por mililitro y porcentaje de viabilidad de la suspensión de *C. arabica* durante 14 días de cultivo.

Figura 5.9. Variación del porcentaje de células de tipo 1, durante 14 días de cultivo de suspensiones celulares de *C. arabica*.

Figura 5.10. Variación del número de células totales, volumen de paquete celular y pH con respecto al tiempo de suspensiones celulares de *C. arabica* en cultivo semicontinuo ($D = 0.006\text{h}^{-1}$).

Figura 5.11. Variación del volumen de paquete celular y del pH con respecto a la velocidad de dilución en cultivo semicontinuo.

Figura 5.12. Variación del porcentaje de células en cultivo semicontinuo durante la determinación de la velocidad de dilución óptima.

Figura 5.13. Variación del porcentaje de volumen de paquete celular (VPC) y del pH en cultivo semicontinuo a velocidad de dilución constante.

Figura 5.14. Variación del porcentaje de células en cultivo semicontinuo a velocidad de dilución constante.

Figura 5.15. Variación del porcentaje de los tipos de células en suspensiones celulares de *C. arabica* en cultivo semicontinuo.

Figura 5.16. Variación del porcentaje de volumen de paquete celular y pH en suspensiones celulares de *C. arabica* en cultivo semicontinuo.

Figura 17. Análisis del consumo de la fuente de carbono en cultivo semicontinuo por cromatografía en capa fina. Estánda
Wsssszqaq res: F (fructosa), S (sacarosa), G (glucosa).

Figura 5.18. Comportamiento del volumen de paquete celular y del pH en cultivo semicontinuo con baja concentración de reguladores de crecimiento.

Figura 5.19. Variación del porcentaje de los diferentes tipos de células con respecto al tiempo de suspensiones celulares de *C. arabica* en cultivo semicontinuo con baja concentración de reguladores de crecimiento.

Figura 5.20. Variación del porcentaje de volumen de paquete celular y pH con respecto al tiempo de suspensiones celulares de *C. arabica* en cultivo semicontinuo.

Figura 5.21. Incremento del porcentaje de células de tipo 1 con respecto al tiempo de suspensiones celulares de *C. arabica* en cultivo semicontinuo.

RESUMEN

La embriogénesis somática es una metodología para la regeneración y propagación *in vitro* de especies vegetales de interés. Permite reproducir plantas en forma masiva en cualquier época del año a partir de explantes de una planta seleccionada, aumentando su capacidad de multiplicación en menor tiempo que los métodos tradicionales.

Para algunas especies, la embriogénesis somática se ha podido desarrollar en medio líquido, con la ventaja de poder mantener las suspensiones celulares en una fase de multiplicación, siendo posible inducir la embriogénesis en el momento requerido.

Una de las características de las suspensiones celulares vegetales es la tendencia a la heterogeneidad en la morfología de su población celular. Las células de tipo meristemático, que son las que dan origen a los embriones, se encuentran en menor porcentaje. La proporción de los diferentes tipos de células depende de la composición del medio de cultivo, la edad de cultivo y de la especie.

El objetivo principal de este trabajo fue obtener una suspensión celular de *C. arabica* L. con el mayor porcentaje de agregados de células de tipo meristemático en la fase de multiplicación. Para lograrlo, se implementó un sistema de cultivo semicontinuo. En este tipo de cultivo parte de la suspensión es removida a intervalos establecidos y reemplazado por una cantidad equivalente de medio fresco a una velocidad constante. Con el objetivo de mantener constante el volumen del medio de cultivo en el reactor hay una salida de suspensión a la misma velocidad.

La suspensión celular se caracterizó por estar constituida por 4 tipos de células, las cuales fueron clasificadas por su morfología. En un ciclo de cultivo por lotes en matraces con una duración de 14 días, el porcentaje inicial de células meristemáticas, llega a un máximo de 33% a los 8 días de cultivo. El establecimiento de un cultivo semicontinuo permitió obtener un máximo de 48%, a una velocidad de dilución constante de 0.0117 h^{-1} .

El equipo diseñado para establecer el cultivo semicontinuo arrojó resultados satisfactorios. Permite mantener la suspensión en condiciones estériles, se puede tomar muestras con bajo riesgo de contaminación, permite realizar cambios de los recipientes donde se encuentran el medio de cultivo y el de recuperación de la suspensión. El sistema es controlado por medio de un controlador lógico programable y la velocidad de dilución puede ser ajustada de acuerdo a las necesidades del cultivo.

Posteriormente se realizó el cultivo semicontinuo con ciclos de cambio total del medio cada 48 horas. Se logró de esta manera un máximo de 93.3 % de células de tipo meristemático a los 7 días de cultivo semicontinuo.

ABSTRACT

Somatic embryogenesis is an *in vitro* process for the regeneration and propagation of plant species of commercial interest. It allows the massive reproduction of plants at any time of the year starting with explants from a selected individual, thus increasing its multiplication capacity in a much shorter time compared than traditional methods.

For some species, somatic embryogenesis has been developed in liquid medium, with the advantage of maintaining a cell suspension in its multiplication phase, but with the capability of inducing embryogenesis at any time required.

One characteristic of plant cell suspensions is their tendency toward heterogeneity in the cell population's morphology. Meristematic-type cells, which give origin to embryos, are present in a lower percentage. The ratio of the different types of cells depends on the species, culture medium composition and culture age.

The main objective of this work was to obtain a cell suspension of *Coffea arabica* L, with the highest percentage of meristematic-type cell aggregates in multiplication phase. In order to achieve this, a semicontinuous culture system was implemented. In this process, part of the suspension is removed from the bioreactor at established periods of time and renewed by an equivalent quantity of fresh medium. This is done at constant speed. In this manner, the volume of medium into the bioreactor remains constant

The equipment designed to establish the semicontinuous culture gave good results. It allowed to maintain the suspension under sterile conditions. Sampling can be made with low contamination risks. Changes of reservoirs can also be made without any problem. The whole system is controlled by a programmable logic controller so the dilution rate can be adjusted according to culture characteristics.

Four types of cell were present in the cell suspension and they were classified according to their morphology. In a batch culture cycle of 14 days, the percentage of meristematic cells rises to a maximum of 33% after 8 days of culture. In semicontinuous culture a maximum of 48% meristematic cells was obtained, with a constant dilution rate of 0.0117 h^{-1} . In a semicontinuous culture with total change of medium every 48 hours carried out at the same dilution rate, 93.3% of meristematic cells was achieved at 7 days of culture.

INTRODUCCION

La semilla del cafeto es uno de los productos más importantes de exportación a nivel mundial. Entre sus diferentes especies, *Coffea arabica* acapara un gran porcentaje de la producción y consumo. En nuestro país, 90 % de la producción de café corresponde a esta especie. Se cultiva principalmente en los estados de Chiapas, Veracruz, Oaxaca y Puebla.

Su cultivo presenta algunos problemas, de los cuales podemos citar los siguientes: actualmente, las plantaciones en producción están formadas por plantas viejas por lo que es necesario renovarlas. Para mejorar la producción, se necesita de plantas más rendidoras, resistentes a plagas y enfermedades así como también de plantas resistentes a condiciones climáticas extremas como puede ser la sequía, que se presenta cada vez con más frecuencia. Por lo tanto, es necesario contar con una técnica que permita la propagación masiva de plantas con características determinadas. La embriogénesis somática se presenta como una alternativa de micro propagación para este tipo de cultivo. Esta técnica nos permite obtener embriones a partir de agregados celulares, los cuales se desarrollan pasando por estados semejantes a los que pasa un embrión cigótico, para dar origen a una planta, (Michaux-Ferrière et al., 1987; Zimmerman, 1993). Una de las ventajas de la embriogénesis somática, es que se puede desarrollar en medio líquido. Con esta alternativa se pueden mantener suspensiones celulares en fase de multiplicación incrementando el rendimiento con respecto a la utilización de medios sólidos (Staritsky y Van Hassell, 1980, Neuenschwander y Baumann, 1992).

Se considera que el potencial embriogénico de las suspensiones depende del tipo de células que se encuentre en mayor porcentaje. Sin embargo esta característica se ve afectada grandemente debido al alto grado de heterogeneidad en la población celular. Se reporta que las células que dan origen a los embriones varía de 0.1 al 20 % del total de la población (Söndahl et al. 1985, Vasil y Vasil, 1985).

Con el objetivo de obtener suspensiones homogéneas con una población mayoritaria en células de tipo meristemático, se ha recurrido a tratamientos químicos y métodos físicos de enriquecimiento. Sin embargo, los tratamientos químicos pueden cambiar las propiedades bioquímicas de la célula, pudiendo afectar la expresión de algunos genes. Por métodos físicos se puede obtener una suspensión estable por lo menos después de 3 meses de tratamiento. Para enriquecer una suspensión celular existe la posibilidad de utilizar el cultivo semicontinuo. En este tipo de cultivo, parte del volumen de la suspensión celular es removido y reemplazando por una cantidad equivalente de medio fresco a la misma velocidad. En suspensiones celulares de plantas, el cultivo continuo se ha utilizado como una herramienta para el estudio de los cambios fisiológicos de la célula relacionados con los cambios ambientales (Dougall et al., 1983). También se ha utilizado para realizar estudios de crecimiento y rendimiento de suspensiones celulares bajo condiciones de exceso y limitación de nutrientes (Dougall et al., 1983; Luuk et al. 1995, Veith and Komor 1993, Ostadan y Van der Plas, 1996), así como los factores que afectan la formación de productos y para la obtención

de metabolitos secundarios a gran escala (Meijer et al., 1994; Rokem y Goldberg, 1983; Sahai y Shuler, 1984; Hoopen et al 1992).

En este trabajo se reporta el uso del cultivo semicomtinuo, como herramienta para favorecer la presencia de células de tipo meristemático en las suspensiones celulares de *Coffea arabica*.

CAPÍTULO 1

Antecedentes

IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL CAFETO

Coffea arabica L. nombrada comúnmente arábica; es originaria del norte de África (Etiopía). Crece en tierras altas, aproximadamente a 1,800 msnm y en climas templados. *Coffea canephora* P. conocida comúnmente como robusta, es originaria de África Central; crece en tierras de bajas altitudes (900 msnm), en áreas calientes y húmedas.

Entre estas dos especies los granos de café difieren en composición química. Los de *C. arabica* contienen mayor concentración de lípidos, trigolina y sacarosa, mientras que los de *C. canephora* contienen mayor concentración de ácido clorogénico y cafeína (Parliment y Stahl, 1995).

La importancia de estas dos especies, radica en que acaparan la mayor parte del mercado internacional del café. Se considera que la producción de *C. arabica* equivale aproximadamente al 70% del consumo de café en el mundo por tener las mejores características organolépticas y bajo contenido en cafeína. Mientras que *C. canephora* tiene casi un 30% de la producción a nivel mundial, su valor comercial se debe a su alto contenido de sólidos solubles por lo que a partir de ella se produce el café instantáneo.

La llegada del cafeto a nuestro continente se origina en el siglo XVII, a través de las islas de Puerto Rico y Santo Domingo, de las que se expande a América Latina. En México, la llegada del café tuvo lugar hace aproximadamente 200 años a través de tres rutas. Las primeras plantas de cafeto provinieron de Cuba y arriban a Córdoba, Veracruz, en 1796 traídas por el Sr. Juan Antonio Gómez. En 1823, semillas de cafeto son importadas de la región de Mokka en Arabia, al estado de Michoacán. Finalmente en 1847 plantas de cafeto son introducidas a la región de Tuxtla Chico en Chiapas, a partir de Guatemala. A través de estas tres rutas se expanden por lo menos a 12 estados del país (Echeverría y Lira, 1999).

El cafeto se cultiva en 4 regiones del país:

- a) Región del Golfo de México: de la que forman parte los estados de San Luis Potosí, Querétaro, Puebla, Veracruz y Tabasco.
- b) Región del Océano Pacífico: integrada por los estados de Nayarit, Jalisco, Colima, Guerrero y Oaxaca.
- c) Región del Soconusco: a la que corresponde parte del estado de Chiapas (aunque geográficamente puede ser catalogado en la Región del Pacífico).
- d) Región del Norte: conformada por las partes del norte y centro del estado de Chiapas.

La mayor producción del país se encuentra concentrada en tres variedades de *C. arabica*: Typica con un 33% de la producción, seguida por Caturra con 26% y Bourbon con 17%. Otras variedades menos importantes de la especie de *C. arabica* son: Mundo Novo, de la cual se cultiva un 10 %, Garnica con 6% y Catuai y Catimor en menor proporción con un 3 y 2 %, respectivamente. En el caso de la especie *C. canephora*, su única variedad Robusta contribuye con sólo el 3% de la producción nacional, la cual es cultivada en Chiapas, Veracruz y Oaxaca (Echeverría y Lira, 1999).

México exporta a 58 países y se encuentra en el cuarto lugar en el mundo como productor y exportador de café. El cultivo, así como su procesamiento y comercialización da origen a más de 3 millones de empleos en el país (Echeverría y Lira, 1999).

TAXONOMÍA DEL CAFETO

El café es una planta que forma parte de la familia de las Rubiáceas, de flores blancas con aroma ajazminado, cuya semilla es uno de los más importantes productos de exportación en el mundo.

La taxonomía del café puede ser considerada de la siguiente manera (Menas et al., 1978):

- Grupo: Fanerógama.- planta de órganos y tejidos diferenciados (órganos sexuales visibles).
- Clase: Angiosperma.- semillas en ovarios cubiertos y protegidos.
- Orden: Rubiales.- dicotiledónea con ovarios ínferos, flor radiada, tetra o pentámera (4 - 5 piezas en cada verticilo)
- Familia: *Rubiáceae*.- rubial que posee flores actinomorfas (regulares), tetracíclicas (cuatro verticilos), pentámera, ovario inferior bilobulado y óvulos uniteguminados, hojas simples con estipulas. Sus frutos son drupas (o bayas drupáceas) con dos semillas y mesocarpio carnoso, su endocarpio cartilaginoso duro está formado por una capa llamada comúnmente pergamino. Cada semilla posee una membrana sedosa y fina llamada película.
- Género: *Coffea*.- establecido por Linnaeus en 1735. Anteriormente se consideraba al café como un jazmín (*Jasminum arabicum lavifolia*) (Coste, 1980).
- Especie: existen alrededor de setenta especies agrupadas en cuatro secciones (Chevalier, 1929; citado por Söndahl y Lauritis, 1992):

- 1) Paracoffea (13 especies)
- 2) Argocoffea (11 especies)
- 3) Mascarocoffea (18 especies)

4) Eurocoffea (24 especies)

La sección Eurocoffea se subdivide en cinco sub-secciones (Söndahl et al., 1979a):

- Erythrocoffea (*C. arabica*, *C. canephora*, *C. congensis* y *C. eugenioides*).
- Pachycoffea (*C. liberica*, *C. dewevrei* y otras dos especies)
- Melannocoffea
- Nacocoffea
- Mozambicoffea.

PROPAGACIÓN DEL CAFETO

La dotación cromosómica del cafeto corresponde a la fórmula base $n=11$. *C. canephora* es diploide $2n=22$, como la mayoría de las especies, es alógama, auto-estéril, se propaga por métodos asexuales como estacas e injertos para evitar los problemas de auto-incompatibilidad. Esta especie se utiliza para el mejoramiento del cafeto debido a que proporciona genes de resistencia a la roya y a varias especies de nemátodos. *C. arabica* es tetraploide con $2n=44$, es auto-compatible (autógama), se propaga generalmente por semilla. Hay algunas excepciones a la regla cromosómica, por ejemplo las variedades *poliploides* (*C. arabica* vars. Bullata y Crammer, $2n=66$ y $2n=88$ respectivamente, etc.), cuyo interés es prácticamente académico (Parliment y Stahl, 1995).

Convencionalmente la producción de nuevas variedades se ha limitado debido a la uniformidad genética en el número de cromosomas (diploides contra tetraploides), auto-incompatibilidad de alelos (especies diploides) y largos ciclos de cultivo (Anthony et al., 1997). La creación de nuevos híbridos interespecíficos fértiles en condiciones naturales es casi imposible, para lograrlo los genetistas han recurrido a tratamientos con colchicina para doblar el número de cromosomas de las especies diploides, consiguiendo el cruzamiento con las variedades tetraploides de *C. arabica* (Coste, 1980). Al híbrido obtenido entre *C. arabica* y *C. canephora* se le denomina Arabusta (Parliment y Stahl, 1995).

CULTIVO *IN VITRO* DEL CAFETO

Las técnicas de cultivo *in vitro* han sido empleadas en diversos trabajos de investigación utilizando el género *Coffea*. El primer trabajo reportado fue el cultivo de callos a partir de tallos ortotrópicos para la regeneración de plántulas de cafeto (Staritsky, 1970). El cultivo de callos ha sido establecido de casi todas las partes de la planta: hojas, endospermo, tallo, fruto, meristemo, anteras, microesporas y embriones, exceptuando las raíces (Baumman y Neuenschwander, 1990).

Townsley (1974), estableció el cultivo en suspensión de células a partir de callos friables derivados de tallos ortotrópicos de *C. arabica* cv. El Salvador, para la producción de compuestos aromáticos. Las propiedades aromáticas y algunas características de tostado del grano del café se obtuvieron al tostar las suspensiones celulares creciendo en medio PRL- 4 más un 10% de leche de coco.

Producción de lípidos

Estudios bioquímicos han sido realizados para comparar la composición de los ácidos grasos de suspensiones celulares de café, con la de las hojas, tallos y de las semillas verdes del cafeto. En ellos se determinó que la composición de los ácidos grasos en las suspensiones son muy similares a los de las hojas y tallos del cafeto, pero difieren de las semillas por la presencia del ácido linoleico y la ausencia de ácido araquídico (Van Voort y Townsley, 1974). En cultivos de células en suspensión de *C. arabica* se realizaron análisis de lípidos insaponificables, demostrándose la presencia de tres esteroides: β -sitosterol, estigmasterol y campesterol como los mayores componentes de los lípidos insaponificables de la célula, que también están presentes en los granos de café. En estos análisis se observó la presencia de dos alcoholes diterpenoides: cafesterol y kawool, los cuales son los mayores componentes de los aceites insaponificables de los granos de café, (Van Voort y Townsley, 1975). La presencia de estos dos alcoholes en suspensiones celulares de café podría sugerir que el cultivo de células mantiene su habilidad para sintetizar compuestos semejantes a los que se encuentran en las plantas de origen (Monaco et al., 1977).

El cultivo de células en suspensión de *C. arabica* ha sido utilizado como un modelo de estudio para determinar el contenido de ácido clorogénico (5-CGA), el cual se encuentra almacenado en las vacuolas de las células diferenciadas que no se dividen. Su formación es incrementada por factores foto ambientales así como por estrés osmótico (Buckland y Townsley, 1975; Baumann y Röhrig, 1989).

Producción de alcaloides

El cultivo de suspensiones de cafeto también se ha utilizado para estudios de la biosíntesis de alcaloides derivados de la purina: teobromina y cafeína, y de la actividad de la metiltransferasa para la producción de alcaloides (Baumann y Neuenschwander, 1990).

En suspensiones celulares se ha observado que la cafeína es producida en concentración más alta, comparada con la planta de cafeto. Esta concentración va aumentando conforme aumenta la densidad del cultivo (Buckland y Townsley, 1975). Se ha observado que existen algunos factores relacionados con la producción de cafeína y de alcaloides derivados de la purina, como son el tamaño del agregado (Haldimann y Brodelius, 1987), y algunos factores ambientales como el estrés osmótico y las concentraciones de cloruro de sodio (Frischknecht y Baumann, 1985).

Para incrementar la producción de metabolitos secundarios en suspensiones celulares de café se ha utilizado el método de inmovilización de células, el cual consiste

en la inmovilización de cultivos de células de plantas fijadas en una matriz de gel que puede proveer las condiciones que conducen a la diferenciación celular, obteniendo altos rendimientos de metabolitos secundarios. Estas preparaciones con células inmovilizadas pueden ser consideradas como agregados artificiales de células y pueden ser utilizados para investigar los efectos del agrupamiento celular sobre el metabolismo de la célula bajo condiciones definidas. Una de sus ventajas es que se puede controlar el tamaño del agregado y la concentración celular (Scragg, 1991). En suspensiones celulares de *C. arabica* este método se ha utilizado como una herramienta para la producción de alcaloides derivados de la metilxantina (Haldimann y Brodelius, 1987) y para el estudio del efecto de auxinas en la biotransformación de la teobromina a cafeína (Furuya et al., 1991).

Aplicación de los biorreactores

El uso de biorreactores además de poder incrementar el volumen del cultivo, permite monitorear y controlar las condiciones del mismo, como el pH, el oxígeno disuelto, el dióxido de carbono y las concentraciones de etileno (Ducos et al., 1993).

En biorreactores se han utilizado suspensiones de *C. arabica* como un modelo para el estudio de la biosíntesis y la formación de alcaloides derivados de la purina, y la biotransformación de esteroides (Dubuis et al., 1995; Baumann and Neuenschwander, 1990), así como para realizar estudios de morfología de las células, tamaño de agregados y el suplemento de oxígeno.

Entre los tipos de biorreactores que han sido utilizados, podemos citar el reactor de membrana (Lang et al., 1990), el reactor de lecho fluidizado (Dubuis et al., 1995), el reactor de lecho fluidizado estabilizado magnéticamente (Bramble et al., 1990) y la inmovilización de células en un reactor de columna con burbujeo y controlador de la intensidad de luz (Kurata y Furusaki, 1993). El objetivo común en todos ellos ha sido incrementar la producción de alcaloides.

Debido a su importancia económica, se han buscado alternativas de multiplicación vegetativa *in vitro* de los cafetos, para lo cual se utilizan técnicas de micropropagación como la embriogénesis somática.

La micropropagación del cafeto

La micropropagación del cafeto fue desarrollada por Dublin (1980) y Coste (1980). Esta técnica está basada en el esqueje hortícola, pero realizado *in vitro*, cuyo objetivo es favorecer la callogénesis. Un nudo de tallo ortotrópico compuesto de 2 hojas y un entrenudo es puesto en un medio de cultivo que contiene una citocinina. El propágulo forma un tallo que a su vez se secciona para obtener nuevos micropropágulos. En condiciones óptimas de cultivo, cada micropropágulo puede producir, después de 2 meses de cultivo, de 4 a 6 hojas en un año. Los tallos bien desarrollados son enraizados y transplantados a viveros.

Por medio de la micropropagación se puede producir en un año aproximadamente 20 000 plántulas de café a partir de un sólo micropropágulo, lo cual representa una tasa de multiplicación elevada, ya que un propágulo produce de 100 a 200 plantas en un año (Dublin, 1984).

Embriogénesis somática del café

La embriogénesis somática está definida como el desarrollo de embriones a partir de células somáticas (Michaux-Ferrière et al., 1987, 1989). Estos embriones se desarrollan pasando por estados semejantes a los que pasa un embrión cigótico (globular, corazón, torpedo y cotiledonario) para dar origen a una planta. Esta metodología ha sido una importante vía de estudio para la regeneración de plantas, y principalmente para el estudio de eventos morfogénicos y la comprensión de la regulación de la expresión de los genes en el desarrollo de los embriones cigóticos a embriones maduros en plantas (Zimmerman, 1993).

La capacidad de producir embriones morfológicamente normales a partir de cultivos de células somáticas, se da solamente en plantas. Este proceso es posible ya que las células vegetales tienen la característica de la totipotencialidad, es decir, que una célula tiene el potencial para formar un nuevo individuo genéticamente idéntico al que le dio origen (Zimmerman, 1993; Chaleff, 1983).

Los primeros reportes de embriogénesis somática en café fueron publicados por Staritsky (1970). En su trabajo, obtuvo el desarrollo de callos a partir de fragmentos de tallos ortotrópicos de tres especies de café: *C. canephora*, *C. arabica* y *C. liberica*, pero sólo los callos de *C. canephora* se diferenciaron a embriones somáticos y plántulas.

La embriogénesis somática del café puede producirse por dos vías: directa e indirecta:

- Embriogénesis somática directa o embriogénesis somática de baja frecuencia.- Los embriones somáticos obtenidos por esta vía se originan directamente del tejido en ausencia de la proliferación de callo. Se produce un bajo número de embriones, no todos los embriones presentan un desarrollo morfológico normal (Söndahl et al., 1979b).
- Embriogénesis somática indirecta o embriogénesis somática de alta frecuencia.- Se caracteriza por la formación de un callo friable y un elevado número de embriones formados. El medio de cultivo en la fase de inducción tiene una relación de auxinas y citocininas alta y en el medio de acondicionamiento o mantenimiento hay una baja proporción de las mismas. Además puede contener o no reguladores de crecimiento (Noriega y Söndahl, 1993).

El tipo del callo producido es uno de los factores importantes para la selección hacia la inducción de la embriogénesis, ya que en estudios histológicos de callos de *C. arabica*, se han observado dos tipos:

- Primer tipo: están constituidos por células elongadas semejantes a las del parénquima (25 a 140 μm). Al inicio, el callo es de color café claro, posteriormente el callo va tomando una coloración más oscura y no se observa más proliferación del mismo.
- Segundo tipo: es un callo friable. Se caracteriza por estar formado de un alto porcentaje de pequeñas células isodiamétricas, de 10 a 20 μm de diámetro, con un citoplasma denso, núcleo prominente y rápido ciclo celular (Söndahl y Sharp, 1977; Michaux-Ferrière et al., 1987). A este tipo de células se les considera células meristemáticas. Los agregados formados con este tipo de células se consideran como masas pro-embriogénicas, ya que dan origen a los embriones (Söndahl et al., 1985; Toonen et al., 1994).

Con relación a la composición del medio de cultivo existen dos estrategias para el desarrollo de la embriogénesis somática del caféto:

- Los explantes son cultivados en un medio único, el cual puede contener sólo citocininas (Dublin, 1981; Yasuda et al., 1985) o una asociación de auxinas y citocininas (Dublin, 1980; Pirson et al., 1983).
- Los explantes son cultivados en un primer medio con la finalidad de proliferación de las células, posteriormente se pasan a un segundo medio en el cual se producen las células embriogénicas y se mantienen en multiplicación. (Söndahl y Sharp, 1977, Söndahl et al., 1979b; Dublin, 1984; Zamarripa et al., 1993).

Con el objetivo de obtener una mayor producción de embriones, se desarrolló la embriogénesis somática en medio líquido. Este método ofrece una mayor sincronización y un mayor porcentaje de germinación (Staritsky y Van Hasselt, 1980; Neuenschwander y Baumann, 1992), además de tener la posibilidad de producir embriones somáticos a gran escala utilizando biorreactores, obteniendo de 4,000 a 600,000 embriones por litro en dos meses de cultivo. La productividad es del orden de 5,000 a 10,000 embriones por litro por día. (Zamarripa et al., 1991; Noriega y Söndahl, 1993; Ducos et al., 1993).

Otra ventaja de la embriogénesis somática en medio líquido ha sido poder mantener las suspensiones celulares en fase de multiplicación en cultivos por lote. En estos sistemas, las condiciones de cultivo como son el pH, la osmolaridad y conductividad del medio cambian continuamente. Así como la concentración de los nutrientes, los cuales generalmente disminuyen al ir aumentando la masa celular. Durante el tiempo de cultivo las células van pasando por diferentes fases de crecimiento, algunas células pasan a un estado de diferenciación celular (este tema se analizará en el siguiente capítulo). Como consecuencia, la suspensión se va enriqueciendo con células diferenciadas, las cuales no son embriogénicas. La pérdida de las células de tipo meristemático, afecta directamente al rendimiento de la producción de embriones.

Con base a lo mencionado anteriormente, se propone al cultivo semicontinuo como una alternativa para mantener en la fase exponencial de crecimiento a las células de *C. arabica*, esta fase se caracteriza porque en ella se encuentra el mayor porcentaje de células de tipo meristemático.

Beneficios del cultivo *in vitro*

A partir de los métodos de cultivo *in vitro* se han logrado grandes beneficios en la obtención de especies resistentes a enfermedades producidas por hongos o bacterias; especies resistentes a pesticidas, herbicidas y nemátodos; especies con tolerancia al estrés causado por la temperatura y la humedad. Así como la obtención de semilla artificial para la propagación masiva (Anthony et al., 1997).

Igualmente, se ha mejorado la calidad de la semilla del cafeto al aumentar la cantidad de sólidos solubles, la densidad, el contenido de cafeína y la producción de los compuestos responsables del sabor y aroma del café. Se han obtenido semillas más grandes y uniformes, se ha mejorado su textura y la uniformidad de maduración. (Baumann y Neuenschwander, 1990; Anthony et al., 1997).

De esta manera la biotecnología beneficia directa o indirectamente a diferentes áreas como son la agronomía, la industria y el consumo, al reducir los costos de cosecha, al no utilizar pesticidas y al mejorar la calidad del café.

BIBLIOGRAFIA

- Anthony F., Bertrand B., Lasshermes P. and Charrier A.** (1997) La biología molecular en apoyo al mejoramiento genético del café. Plantations, Recherche, Développement ; nov-déc; 375-377.
- Baumann T. and Röhrig L.** (1989) Formation and intracellular accumulation of caffeine and chlorogenic acid in suspension cultures of *Coffea*. Phytochemistry, 26(10); 2267 - 2669.
- Baumann T. and Neuenschwander B.** (1990) Documentation Analytique. Tissue Culture in Coffee Biotechnology. Café Cacao Thé, (Paris) ; XXXIV (2) avril-juin; 159-164.
- Bramble J-L., Graves D. And Brodelius P.** (1990) Plant cell culture using a novel bioreactor: the magnetically stabilized fluidized bed. Biotech. Prog. 6 (6); 425-457.
- Buckland E. and Townsley P.** (1975) Coffee cell suspension cultures caffeine and chlorogenic acid content. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 8 (3); 164-165.
- Coste R.** (1980) Mejora del Café. Técnicas agrícolas y producciones tropicales, Ed. Blume, San José, Costa Rica.
- Chaleff R. S.** (1983) Isolation of agronomically useful mutants from plant cell culture. Science, 219; 676-682.
- Dublin P.** (1980) Induction de bourgeons néoformés et embryogenèse somatique. Deux voies de multiplication végétative *in vitro* des caféiers cultivés. Café Cacao Thé, (Paris) ; XXIV, (2), avril-juin; 121-130.
- Dublin P.** (1981) Embryogenèse somatique directe sur fragments de feuilles de caféier Arabusta. Café Cacao Thé (Paris), XXV, (4), oct-déc; 237-242.
- Dublin P.** (1984) Techniques de reproduction végétative *in vitro* et amélioration génétique chez les caféiers cultivés. Café Cacao Thé (Paris), XXVIII (4), oct-déc; 231 -243.
- Dubuis B., Oemer M. and Prenosil E.** (1995) Pilot-scale culture of *Coffea arabica* in a novel loop fluidized bed reactor. Plant Cell Tiss. Org. Cult, 43; 171 - 183.
- Ducos J-P., Zamarripa A., Eskes A. and Pétiard B.** (1993) Production of somatic embryos of coffee in a bioreactor. In: 15^e Colloq. Sci. Int. Café, Montpellier, 6-11 june, (pp. 86-96) ASIC, Paris.
- Echeverría I. and Lira A.** (1999) Mexican coffee among world's finest. Claridades Agropecuarias, Special Edition, 1-20.
- Frischknecht P. and Baumann T.** (1985) Stress induced formation of purine alkaloids in plant tissue culture of *Coffea arabica*. Phytochemistry, 24(10); 2255-2257.

Furuya T., Orihara Y. and Koge K. (1991) Biotransformation of theobromine to caffeine in suspension and polyurethane foam immobilized coffee (*Coffea arabica* L.) cells. *Plant Cell Rep.* 9; 659-662.

Haldimann D. and Brodelius P. (1987) Redirecting Cellular Metabolism by Immobilization of Cultured Plant Cells: A Model Study with *Coffea arabica*. *Phytochemistry*, 26(5); 1431-1434.

Kurata H. and Furusaki S. (1993) Immobilized *Coffea arabica* Cell Culture Using a Bubble -Column Reactor with Controlled Light Intensity ; *Biotech. Bioeng.* ; 42; 494-502.

Lang J., Kwang-Hun Y. and Prenosil J. (1990) Effect of Permeate Flux Rate on Alkaloid Production in a Novel Plant Cell Membrane Reactor Using *Coffea arabica* Cells. *Biotech. Prog.* 6; 447-451.

Menas T., Ferrer G. y Grarte R. (1978) *Fitotecnia del Café*. Ed. Pueblo y Educación. Habana Cuba. Capitulo 2, pp. 5-35.

Michaux-Ferrière N., Dublin P. and Schwendiman J (1987) Étude histologique de l'embryogenèse somatique à partir d'explants foliaires de *Coffea arabica* L. *Café Cacao Thé* (Paris) ; XXXI, No 2, avril-juin; 103-110.

Michaux-Ferrière N, Bieysse D, Alvard D. and Dublin P. (1989). Étude histologique de l'embryogenèse somatique chez *Coffea arabica*, induite par culture sur milieux uniques de fragments foliaires de génotypes différents. *Café Cacao Thé*, (Paris); XXXIII (4); 207-217.

Monaco L., Söndahl M, Carvalho A., Crocomo O. and Sharp W. (1977) Applications of Tissue Culture in the Improvement of Coffee. In: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Ch. 6, 109-129. Ed. Springer-Verlag, New York .

Neuenschwander B. and Baumann T. (1992) A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Plant Cell Rep.* 10; 608-612.

Noriega C. and Söndahl M. (1993) Arabica Coffee Micropropagation Through Somatic Embryogenesis *via* Bioreactors. In: 15^e Colloq. Sci. Int. Café, Montpellier, 6-11 june; 73-81. ASIC, Paris.

Parliment T. and Stahl H. (1995) What makes that coffee smell so good?. *CHEMTECH*, august; 38-47.

Pirson E. S., van Lammeren A., Schel J. H. and Staritsky G. (1983) *In vitro* Development of Embryoids from Punched Leaf Discs of *Coffea canephora*. *Protoplasma*, 115; 208-216.

Scragg A. (1991) The Immobilization of Plant Cells. *Plant Cell and Tissue Culture*, Edited by Stafford and Warren, Ch. 8; The University Press, Buckingham; 205-219.

Söndahl M. and Lauritis J. (1992) Coffee. Biotechnology of perennial fruit crops, Cambridge, chapter 17 ; The University Press, Cambridge. pp. 401-420

Söndahl M., Nakamura T. and Sharp W. (1985) Propagation of Coffee. Basic Life Sci, 32; 215-232.

Söndahl M., Salisbury J. L. and Sharp W. (1979b) SEM Characterization of Embryogenic Tissue and Globular Embryos During High Frequency Somatic Embryogenesis in Coffe Callus Cells. Z. Pflanzenphysiol, 94; 185-188.

Söndahl M. and Sharp W. (1977) High Frequency Induction of Somatic Embryos in Cultured Leaf Explants of *Coffea arabica* L. Z. Pflanzenphysiol, 81; 595-408.

Söndahl M., Spahlinger D. and Sharp W. (1979a) A Histological Study of High Frequency and low Induction of Somatic Embryos in Cultured Leaf Explants of *Coffea arabica* L. Z. Pflanzenphysiol, 94;101-108.

Staritsky G. (1970) Embryoid Formation in Callus Tissues of Coffee. Acta Bot. Neerl. 19 (4); 509-514.

Staritsky G. and Van Hasselt G. (1980) The synchronized mass propagation of *Coffea arabica* *in vitro*. 9ème Colloq. Sci. Int. Café, Londo, Vol. 2 (pp. 597-602) ASIC, Paris.

Toonen M., Hendriks T., Schmidt E. D., Verhoeven H. A., van Kammen A. and de Vries S. (1994) Description of somatic embryo forming single cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking. Planta, 194; 565-572.

Townsley P. M. (1974) Production of Coffee from Plant Cell Suspension Cultures. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 7(1); 79-81.

Van Boxtel J and Berthouly M. (1996) High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 44; 7-17.

Van Voort F. and Townsley P. M. (1974) A gas chromatographic comparison of the fatty acids of the green coffee bean *Coffea arabica* and the submerged coffee cell culture. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 7; 82-85.

Van Voort F. and Townsley P. M. (1975) A comparison of the unsaponifiable lipids isolated from coffee cell cultures and from green-coffee beans. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 7; 199-201.

Yasuda T., Fujii Y. and Yamaguchi T. (1985) Embryogenic Callus Induction from *Coffea arabica* Leaf Explants by Benzyladenine. Plant Cell Phys. 26 (3); 597 –597.

Zamarripa A. (1993) Etude et développement de l'embryogenèse somatique en milieu liquide du caféier (*Coffea canephora* P.; *Coffea arabica* L. et l'hybride Arabusta). Tesis de

Doctorado, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes, Francia, 191p.

Zamarripa A., Ducos J-P., Bollon H., Dufour M. and Pétiard V. (1991) Production d'Embryons Somatiques de Caféier en Milieu Liquide: Effets de la Densité d'Inoculation et Renouvellement du Milieu. *Café Cacao The*, (Paris), XXXV (4) oct-déc; 233-243.

Zimmerman J. L. (1993) Somatic Embryogenesis: Model for Early Development in Higher Plants. *The Plant Cell*, 5; 1411-1423.

CAPÍTULO 2

Suspensiones Celulares de Plantas

CARACTERÍSTICAS DE LAS SUSPENSIONES

Las suspensiones celulares de plantas consisten en un cultivo de células en medio líquido con los requerimientos nutricionales y ambientales necesarios para su crecimiento y multiplicación (Hall, 1991).

El medio básico en los cultivos de callos y suspensiones celulares de plantas consiste en una mezcla de sales minerales. La fuente de carbono utilizada usualmente es la sacarosa, en algunos casos se requiere de vitaminas y reguladores de crecimiento. La composición y la concentración de estos compuestos varía dependiendo de la especie y el objetivo del cultivo (Mandels, 1972; Scragg y Fowler, 1985).

El cultivo de células en suspensión se inicia a partir de la transferencia de una masa desorganizada de células (callo), preferentemente de textura friable, a un matraz con medio líquido, el cual se mantiene en agitación constante. El callo se desagrega dando origen a la formación de agregados y células libres. El mantenimiento de las suspensiones se lleva a cabo por resiembras entre 4 días a 4 semanas de cultivo (dependiendo de la especie y las condiciones de cultivo), con una densidad de inóculo que oscila entre 5 a 20% en peso de materia fresca por volumen de medio (Narayanawamy, 1977).

A diferencia de los cultivos de microorganismos, el cultivo de células de vegetales tiene una velocidad de crecimiento lenta. Su tiempo de duplicación varía entre 24 y 150 horas (Taticek et al., 1991).

Características de las células en suspensión

El contenido de agua en la célula es de aproximadamente 95% y los productos que genera usualmente se encuentran en el interior de la misma. Las células jóvenes son generalmente pequeñas y contienen un gran número de pequeñas vacuolas, mientras que las células viejas poseen una vacuola grande. Este último tipo de célula, es muy sensible a los cambios de potencial osmótico y al cizallamiento (Taticek et al., 1991).

Una de las principales características de las suspensiones celulares de plantas es su alto grado de heterogeneidad en la población celular, debido a que algunas células durante el tiempo de cultivo, van tomando diferentes tamaños y formas (Vasil y Vasil, 1981; Taticek et al., 1991). Hasta el momento, en la literatura no hay una uniformidad en la clasificación de las células. Uno de los criterios utilizados para su clasificación es la estructura morfológica de las mismas. En un cultivo se puede

observar células esféricas (12 a 40 μm de diámetro), ovaladas (30x60x10-20 μm), alargadas y gigantes. En el caso de suspensiones celulares de tabaco se han observado células de hasta 300 μm de diámetro (Tanaka, 1981; Wilson, 1980; Narayanaswamy, 1977).

Formación de agregados

Es raro que las células de plantas crezcan individualmente en una suspensión. Por lo general crecen en agregados de 2 hasta más de 300 células. Su tamaño puede variar dependiendo del método de subcultivo, las condiciones y el tiempo del cultivo, la edad de la suspensión y la especie. En las células jóvenes que se dividen rápidamente, los agregados pueden ser el resultado de algunas células que no se separan después de su división. Los agregados de células viejas, usualmente se forman después de la fase exponencial de crecimiento, debido a la secreción de polisacáridos y proteínas, lo que causa que éstas se adhieran unas a otras. La formación de agregados grandes tiene como consecuencia la heterogeneidad en la población celular, debido a que las células que se encuentran en la periferia del agregado experimentan diferentes condiciones ambientales de las que se encuentran en el centro del mismo. En este tipo de agregados hay una mala difusión de nutrientes y una deficiente transferencia de materia, particularmente del oxígeno. Causan algunos problemas en el mezclado de las suspensiones, ya que tienden a sedimentar y propician altas viscosidades en el medio de cultivo (Taticek et al., 1991).

Aplicación de las suspensiones

Las suspensiones celulares de plantas se consideran como una importante alternativa a los métodos tradicionales de producción de metabolitos secundarios, los cuales son utilizados para la producción de medicinas (codeína, diosgenina), estimulantes (cafeína), insecticidas (piretrinas), perfumes (jasmín), pigmentos (shiconina) y saborizantes (Fowler, 1984; Kreis y Reinhard, 1989). Pueden ser cultivadas a gran escala, si están bien mezcladas, de manera análoga a los procesos de fermentación con microorganismos. Sin embargo, se han presentado algunos problemas asociados a la baja velocidad de crecimiento, la sensibilidad al cizallamiento, la formación de agregados celulares y en algunos casos, su bajo rendimiento en productos extracelulares, generalmente asociados con su crecimiento (Taticek et al., 1991; King, 1980).

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

La embriogénesis somática es un proceso biológico de regeneración que permite la obtención de embriones a partir de células somáticas. Estos embriones se desarrollan pasando por estados idénticos a los que pasa un embrión cigótico: globular, corazón, torpedo y cotiledonario. Durante su desarrollo la célula no pierde la información genética sino la capacidad de usar esa información (Amirato, 1984; Zimmerman, 1993).

El sistema de multiplicación por embriogénesis somática puede ser desarrollado en cuatro fases (Murashige, 1974; Amirato, 1984; Zimmerman, 1993):

1. **Selección del material.**- El material para iniciar el cultivo de células puede provenir de diferentes partes de la planta: de un explante de hoja, tallo, raíz o cotiledón. En el caso del café, las hojas son las más utilizadas como material de inicio. Se debe trabajar en condiciones estériles, por lo que el material debe ser tratado previamente con una solución tensoactiva y luego con hipoclorito de sodio al 5 %.
2. **Inducción del callo.**- Se utiliza generalmente un medio semi-sólido para la inducción y producción del callo. Su formación depende de la especie de la planta. El proceso puede tardar entre 3 y 8 meses. En el caso del café, la formación de callo se inicia con la cicatrización de los bordes de la hoja, las células forman un callo blanco a oscuro considerado como callo primario. Este callo pasa luego a una segunda etapa, donde se forma un segundo grupo de células embriogénicas por diferenciación celular, considerado como callo secundario. Este fenómeno se va propagando progresivamente a la totalidad del callo.
3. **Fase de multiplicación.**- En esta fase, el callo embriogénico es transferido a un medio líquido con una densidad de inóculo óptima para la multiplicación de las células embriogénicas. Los agregados celulares se mantienen en una etapa de multiplicación celular. Esta fase puede ser utilizada en dos diferentes formas: para el mantenimiento de la línea celular y para la generación de biomasa para la etapa de expresión de la embriogénesis. Generalmente, se utiliza un medio similar a la inducción del callo embriogénico (de segunda etapa).
4. **Expresión de la embriogénesis.**- En esta fase tiene lugar la formación del embrión, que pasará por los estados globular, corazón y torpedo. Dependiendo de la especie puede haber presencia de reguladores de crecimiento en el medio y en algunos casos ser omitidos.

Suspensiones embriogénicas

Tanto en las especies dicotiledóneas como monocotiledóneas, se ha considerado que el potencial embriogénico de una suspensión celular depende del tipo de células que se encuentren en mayor porcentaje (Söndahl et al., 1985; Smith y Krikorian, 1990), y que existe una correlación entre el potencial embriogénico y la morfología de las células (Nomura y Komamine, 1985).

Las suspensiones embriogénicas se caracterizan por la presencia de agregados celulares proembriogénicos integrados por pequeñas células isodiamétricas que se encuentran en división activa, con citoplasma denso, núcleo bien definido, pequeñas vacuolas y abundantes granos de almidón (Vasil y Vasil, 1985; Williams y Maheswaran, 1986; Fowler, 1984; Smith y Krikorian, 1990; Halperin, 1995).

En función a su morfología, este ha sido un criterio que ha permitido clasificar las células que se encuentran en suspensión y en el callo como embriogénicas. Algunos

ejemplos de especies de plantas en las que se ha utilizado este criterio se citan en el Cuadro 2.1.

Debido a que este tipo de células se encuentra en constante multiplicación, las células se consideran de tipo meristemático (también nombradas células meristemáticas) y representan el centro de crecimiento de las suspensiones (Gresshoff, 1980; Berthouly y Michaux-Ferrière, 1996).

El porcentaje de estas células en las suspensiones por lo general es muy bajo, varía de 0.1 a 20% (Vries et al. 1988; Vasil y Vasil, 1985) dependiendo de la especie, las condiciones y el medio de cultivo, el tiempo de subcultivo y la edad de la suspensión.

Es importante recalcar que las células meristemáticas se encuentran presentes tanto en suspensiones embriogénicas como no embriogénicas, debido a que la presencia de proteínas extracelulares (Gavish et al., 1991), así como señales moleculares (Schmidt et al., 1994) y la expresión de algunos genes, entre otras diferencias bioquímicas, las hacen diferentes en cuanto a su poder embriogénico (Wann et al., 1987; Wilde et al., 1988).

El mayor porcentaje de la población celular en las suspensiones, son células diferenciadas. En función a su morfología se nombran como células altamente vacuoladas o gigantes y alargadas, las cuales no son embriogénicas (Sondahl et al., 1985; Vasil y Vasil, 1985; Smith y Krikorian, 1990; Terakawa et al., 1992; Redway et al., 1990; Tabaeizadeh y Campeau, 1992; Chung y Nguyen, 1990; Baeksted, 1998). Algunos ejemplos de especies de plantas en las que se ha utilizado este criterio se citan en el Cuadro 1. Las células largas mueren al llegar a su madurez, en algunos casos se ha reportado que las células alargadas y las vacuoladas se dividen muy lentamente (Halperin 1995; Chin-Yu y Vasil, 1981).

Se considera que hay una correlación entre el grado de diferenciación y la acumulación de metabolitos secundarios, favoreciendo los agregados grandes la obtención de mejores rendimientos en estos productos (Halldimann y Brodelius, 1987; Yeoman, 1987).

El proceso de elongación de las células tiene lugar debido a la presión de turgencia. La pared celular se expande acompañada de la absorción de agua y el incremento a lo largo del tamaño de la vacuola. Durante este proceso hay un incremento de volumen celular, no necesariamente hay un aumento del número de organelos, DNA nuclear o de las proteínas citoplasmáticas (Smith y Krikorian, 1992).

Usualmente la elongación ocurre hacia un sólo lado. Se considera que la elongación de las células depende de las auxinas y de las giberelinas. Estos cambios están influidos de manera importante por la fuente externa de nitrógeno y por las concentraciones de calcio (Smith y Krikorian, 1992).

Cuadro 2.1. Suspensiones celulares de diferentes especies, en las que se ha realizado una clasificación de las células como embriogénicas y no embriogénicas en función a su morfología.

<i>Especie</i>	<i>Referencia</i>
<i>Abies alba</i> L.	Hertmann et al. 1992.
<i>Agrostis polustris</i> Huds.	Terakawa et al., 1992.
<i>Coffea arabica</i>	Staritsky, 1970; Söndahl y Sharp, 1977; Berthouly and Michauz-Ferriere, 1996.
<i>C. intybus</i> L. x <i>C. endivia</i> L.	Dubois et al., 1991.
<i>Citrus aurantium</i> L.	Gavish et al., 1991.
<i>Trifolium repens</i>	Gresshoff, 1980.
<i>Daucus carota</i> L.	Vries et al., 1988; Halperin, 1995; Smith y Krikorian, 1990; Nomura y Komamine, 1985.
<i>Eucalyptus citriodora</i> .	Muralidharan et al., 1989.
<i>Euphorbia pulcherrima</i>	Geier et al., 1992.
<i>Fagus sylvatica</i> L.	Vieitez et al., 1992.
<i>Ipomoea batatas</i>	Chée y Cantliffe, 1989.
<i>Larix X eurolepis</i>	Klimaszewska, 1989.
<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Taylor et al., 1996.
<i>Miscanthus x ogliformis</i> Honda 'Giganteus'	Baeksted, 1998.
<i>Panicum maximun</i> Jacq	Chin y Vasil, 1981.
<i>Paspalum dilataum</i> Poir	Akashi y Adachi, 1992.
<i>Pennisetum americanum</i>	Vasil y Vasil, 1981.
<i>Picea abies</i>	Wann et al., 1987.
<i>Picea glauca</i>	Attree et al., 1987; Bekkaoui, 1987.
<i>Triticum aestivum</i> L.	Chung y Nguyen, 1990; Redway et al., 1990; Qiao et al., 1992; Manddock, 1987.
<i>Triticum aestivum</i> X <i>Leymus angustus</i>	Tabaeizadeh y Campeau, 1992.
<i>Zea mays</i> L.	Fransz y Schel, 1989; Vasil y Vasil 1985.

En el caso de células altamente vacuoladas, éstas crecen individualmente o en agregados de no más de 6 células. Su tamaño varía dependiendo del volumen total de las vacuolas, las cuales incrementan dramáticamente. Eventualmente se forma una vacuola central que constituye el 90% del volumen total de la célula; por lo que las suspensiones son más sensibles a los cambios de potencial osmótico y al cizallamiento (Taticek et al., 1991).

Diferenciación celular

La diferenciación celular puede ser considerada en dos niveles: la citodiferenciación que es un cambio en la forma de la estructura y función de la célula individualmente y un segundo nivel que involucra la organización de células para formar estructuras morfológicamente reconocibles (Yeoman, 1987).

Este proceso puede tener lugar durante el ciclo celular, debido a que algunas células meristemáticas dejan de dividirse para diferenciarse, dando origen a células especializadas que continúan creciendo. Al final, difieren morfológicamente en estructura y función de las células que les dan origen. La diferenciación puede darse inmediatamente después de la división o como un proceso que puede ocurrir en el curso normal del desarrollo de algunas células como respuesta a algún tipo de estímulo externo durante la madurez de las mismas (Witt, 1992).

Algunas células meristemáticas, al dividirse, dan origen a dos tipos de células, una de ellas puede ser una célula meristemática, mientras que la otra es una célula que se expande formando una gran célula vacuolada. Esta característica se ha observado en suspensiones de zanahoria (Toonen et al., 1994), en coníferas (Nagmani et al., 1987) y en *C. arabica* (Söndahl et al., 1985).

La especie, el medio y las condiciones de cultivo pueden influir en la morfología de las células y en sus propiedades fisiológicas. Entre los factores que están relacionados con la diferenciación y crecimiento celular se encuentran la fuente de nitrógeno, especialmente las sales de amonio (el nitrógeno es el principal elemento que afecta la formación de una célula). Cuando las células se mantienen en un medio conteniendo nitratos como única fuente de nitrógeno, se forman células esféricas. La utilización de nitrógeno orgánico como caseína hidrolizada, urea o cisteína, da origen a la excesiva formación de células elongadas (Rashid, 1988).

Los cambios de pH también pueden influir en los cambios morfológicos y fisiológicos de la célula. Adicionalmente, están los factores físicos tales como la aireación (suministro de oxígeno), la iluminación y el potencial osmótico (Takayama y Akita, 1994).

La diferenciación en un cultivo de células de plantas, está relacionado con la acumulación de metabolitos secundarios. Se sugiere que la organización es esencial para el proceso de metabolismo celular. Tal organización puede ser la diferencia entre una baja o alta producción de compuestos en un cultivo. La morfología de la célula y la

densidad de inóculo se encuentran relacionadas con la velocidad de producción de alcaloides y la multiplicación celular (Ellis, 1984).

SUSPENSIONES HOMOGÉNEAS DE CELULAS MERISTEMÁTICAS

Las suspensiones celulares homogéneas son utilizadas para caracterizar líneas celulares, para la obtención de protoplastos, para la inducción de embriogénesis somática y para realizar estudios de citometría de flujo.

El balance de células puede ser manipulado a favor de las células meristemáticas a través de subcultivos más frecuentes, entre 2 y 7 días, esto ayuda a mantener el crecimiento activo de este tipo de células (Hall, 1991). Bajo estas condiciones de trabajo se logró obtener una suspensión estable de *C. arabica* L. cv Caturra, después de 2-3 meses, para la separación de protoplastos (Acuña y Pena, 1991).

Se han buscado alternativas para obtener suspensiones homogéneas y de agregados pequeños de células meristemáticas, con el objetivo de separar protoplastos o cultivar células individuales. Para ello se ha recurrido a diversos métodos, entre los que se encuentran los tratamientos químicos tales como la adición de colchicina, hormonas, degradación de la pared celular con enzimas, adición constante de agua de coco y extractos de levadura. Estos tratamientos pueden cambiar las propiedades bioquímicas de la célula, posiblemente afectando la expresión de algunos genes (Vasil y Vasil, 1985).

Entre los métodos físicos se encuentran el tamizado, la separación de una muestra por gradientes de centrifugación utilizando Ficoll con diferentes concentraciones de sacarosa, entre 10 y 20% (Vasil y Vasil, 1985), y la selección manual con ayuda de una pipeta o jeringa en un microscopio invertido. Estos métodos permiten seleccionar los agregados que contienen células meristemáticas (Nomura y Komamine, 1985). Sin embargo, implican un alto riesgo de contaminación debido a la excesiva manipulación del cultivo. En el caso de tratamientos utilizando centrifugación se ha reportado un bajo porcentaje de viabilidad de las células en las suspensiones, como es el caso de suspensiones de *Capsicum frutescens* Mill. cv Annou donde se reporta una viabilidad de 55 a 65 % (Williams et al., 1988).

Ho y Vasil (1983) propusieron un método de subcultivo para la obtención de suspensiones homogéneas de caña de azúcar. Este método consiste en una agitación vigorosa del matraz en el que se encuentra la suspensión y subcultivar la parte media de la suspensión, que consiste de un 95% de células meristemáticas. Este método de subcultivo ha sido utilizado para la caracterización de suspensiones embriogénicas de trigo (Redway et al., 1990). En este cultivo, se obtuvieron suspensiones con 98 % de células meristemáticas después de 5 meses, sembrando cada semana.

BIBLIOGRAFIA

Acuña R. and Pena M. (1991). Plant regeneration from protoplasts of embryogenic cell suspensions of *Coffea arabica* L. cv. Caturra. Plant Cell Reports, 10; 345-348.

Akashi R. and Adachi T. (1992) Somatic Embryogenesis and Plant regeneration from suspension cultured-derived protoplasts of apomictic dallisgrass (*Paspalum dilatatum* Poir.) Plant Science. 82; 219-225.

Amirato P. V. (1984) Induction, Maintenance and Manipulation of Development in Embryogenic Cell Suspension Cultures. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants(1);. Ed. by Indra K. Vasil ; Academic Press ; 139 – 151 ; Orlando Florida.

Attree S. M., Bekkaoui F., Dunstan D. And Fowke I. (1987) Regeneration of somatic embryos from protoplasts isolated from an embryogenic suspension culture of white spruce (*Picea glauca*). Plant Cell Reports, 6; 480 –483.

Baeksted H. Y. (1998) Growth characteristics and nutrient depletion of *Miscanthus x ogiformis* Honda "Giganteus" suspension cultures. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 53; 143-151.

Berthouly M. and Michaux-Ferrière N. (1996) High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 44; 169-176.

Bekkaoui F., Saxena P., Attree S., Fowke L. and Dunstan D. (1987) The isolation and culture of *Picea glauca* (Moench) Voss. Plant Cell Reports, 6; 476–479.

Chée R. and Cantliffe D. (1989) Composition of embryogenic suspension cultures of *Ipomoea batatas* Poir and production of individualized embryos. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 17; 39-52.

Chin-Yu L. and Vasil K. (1981) Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from freely-suspendend Cells and Cell Groups of *Panicum maximum* Jacq. Ann. Bot. 48; 543-548.

Chung W. and Nguyen H. (1990) A novel approach for efficient plant regeneration from long-term suspension cultures of wheat. Plant Cell Reports, 8; 639-642.

Dubois A., Dubois G. and Vasseur J. (1991) Direct somatic embryogenesis in leaves of *Chichorium*. Protoplasma, 162; 120-127.

Ellis B. E. (1984) Probing secondary metabolism in plant cell culture. Can. J. Bot. 62; 2912-2917.

Fowler M. W. (1984) Large-Scale Cultures of Cells in Suspension. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 1, Vasil K. Chapter 20, pp. 167-174.

Academic Press ; Orlando Florida.

Fransz P., Ruijter N. and Schel J. (1989) Isozymes as biochemical and cytochemical markers in embryogenic callus cultures of maize (*Zea mays* L.) Plant Cell Reports, 8; 67-70.

Gavish H., Vardi A. and Fluhr R. (1991) Extracellular proteins and early embryo development in *Citrus nucellar* cell cultures. Phys. Plant. 82; 606-616.

Geier T., Beck A. and Preil W. (1992) High uniformity of plants regenerated from cytogenetically variable embryogenic suspension cultures of poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch). Plant Cell Reports, 11, 150-154.

Gresshoff P. (1980) *In Vitro* Culture of White Clover: Callus, Suspension, Protoplast Culture and Plant Regeneration. Botanical-Gazette, 14, (2); 157-164.

Halperin W. (1995) *In Vitro* Embryogenesis: Some Historical Issues and Unresolved Problems. *In Vitro* Embryogenesis in Plants, pp. 1-16. Ed. by T. A Thorpe. Kluwer Academic Publishers ; Netherlands.

Hall R. D. (1991) The initiation and maintenance of plant cell suspension cultures. Plant Tissue Culture Manual A3, pp. 1 – 21, Ed. by K. Lindsey, Kluwer Academic Publishers ; Netherlands.

Hall R. D. and Yeoman M. (1986) Temporal and Spatial Heterogeneity in the Accumulation of Anthocyanins in Cell Cultures of *Catharanthus roseus* L. G. Don. J. Exp. Bot. 37, (174); 48-60.

Halldimann D. and Brodelius P. (1987) Redirecting cellular metabolism by immobilization of cultured plant cells: a model study with *Coffea arabica*. Phytochemistry, 26, (5); 1431-1434.

Hertmann S., Lang H. and Reuther G. (1992) Differentiation of somatic embryos from protoplasts isolated from embryogenic suspension cultures of *Abies alba* L. Plant Cell Reports, 11; 554-557.

Ho W-J and Vasil K. (1983) Somatic Embryogenesis in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.): Growth and Plant Regeneration from Embryogenic Cell Suspension Cultures. Ann. Bot., 51; 719-726.

King P. J. (1980) Plant Tissue Culture and the Cell Cycle. Advances in Biochemical Engineering. Plant Cell Culture II, Ed. by A. Fiechter, Vol. 18, 1-37. ; Springer Verlag ; Berlin.

Klimaszewska K. (1989) Recovery of somatic embryos and plantlets from protoplast cultures of *Larix x eurolepis*. Plant Cell Reports, 8; 440-444.

Kreis W. and Reinhard E. (1989) The production of Secondary Metabolites by Plant

Cells Cultivated in Bioreactors. *Planta Medica*. 55; 409-416.

Maddock S. E. (1987) Suspension and protoplast culture of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports*, 6; 23-26.

Mandels M. (1972) The Culture of Plant Cells. In: *Advances in Biochemical Engineering*. Vol. 2, Chapter 6, pp. 201 - 215. Ed. by Chose T., Fiechter and Blakebrough ; Springer Verlag ; Berlin.

Murashige T. and Skoog F. (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Culture. *Phys. Plant*. 15; 473-497.

Murashige T. (1974) Plant Propagation Through Tissue Cultures. *Ann. Rev. Plant Phys.* 25; 135-166.

Muralidharan E., Guota P. and Mascarenhas A. (1989) Plantlet production through high frequency somatic embryogenesis in long term cultures of *Eucalyptus citriodora*. *Plant Cell Reports*, 8; 41-43.

Nagmani R., Becwar M. R. And Wann S. R. (1987) Single-Cell origin and development of somatic embryos in *Picea abies* (L.) Karst. (Norway spruce) and *P. Glauca* (Moench) Voss (white spruce). *Plant Cell Reports*, 6; 157-159.

Narayanaswamy S. (1977) Regeneration of Plants from Tissue Cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. Ed. Tonal and Bajaj. New York.

Nomura K. and Komamine A. (1985) Identification and Isolation of Single Cells that Produce Somatic Embryos at a High Frequency in a Carrot Suspension Culture. *Plant Physiol*, 79; 988-991.

Qiao Y., Cattaneo M., Locatelli F. and Lupotto E. (1992) Plant regeneration from long term suspension culture-derived protoplasts of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports*, 11; 262-265.

Rashid A. (1988) *Cell Physiology and Genetics of Higher Plants*, Vol. 1. Ed. CRR. Florida.

Redway F., Vasil V. and Vasil. Y (1990). Characterization and regeneration of wheat (*Triticum aestivum* L.) embryogenic cell suspension cultures. *Plant Cell Reports*, 8; 714-717.

Schmidt E., Jong A. and de Vries S. (1994) Signal molecules involved in plant embryogenesis. *Plant Mol. Bio.* 26; 1305 –1313.

Scragg A. and Fowler M. (1985) The Mass Culture of Plant Cells. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetic of Plants*, Vol. 2, Chapter 3; 103-129. Ed. Academic Press ; Orlando Florida.

- Smith D. and Krikorian A.** (1990) Low external pH replaces 2,4-D in maintaining and multiplying 2,4-D-initiated embryogenic cells of carrot. *Phys. Plant.* 80; 329-336.
- Smith D. and Krikorian A.** (1992) Low external pH prevents cell elongation but not multiplication of embryogenic carrot cells. *Phys. Plant.* 84; 495-501.
- Söndahl M. and Sharp W.** (1977) High Frequency Induction of Somatic Embryos in Cultured Leaf Explants of *Coffea arabica* L. *Z. Pflanzenphysiol.* 81; 595-408.
- Söndahl M., Nakamura T. and Sharp W.** (1985) Propagation of Coffee. *Basic Life Sci.* Vol. 32; 215-232.
- Staritsky G.** (1970) Embryoid Formation in Callus Tissues of Coffee. *Acta Bot. Neerl.* 19 (4); 509-514.
- Tabaeizadeh Z. and Campeau N.** (1992) Embryogenic cell suspensions of *Triticum aestivum* x *Leymus angustus* F₁ hybrids: characterization and plant regeneration. *Plant Cell Reports*, 11; 81-85.
- Taylor N., Edwards M., Kiernan R., Davey C., Blakesley D. and Henshaw G.** (1996) Development of friable embryogenic callus and embryogenic suspension culture systems in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Nat. Biotech.* 14; 726-730.
- Takayama S. and Akita M.** (1994) The types of bioreactors used for shoots and embryos. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 39; 147-156.
- Tanaka H.** (1981) Technological Problems in Cultivation of Plant Cells at High Density. *Biotech. Bioeng.* XXIII; 1203-1218.
- Taticek R., Murray M. and Legge R.** (1991) The scale-up of plant cell culture: Engineering considerations. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 24; 139-158.
- Terakawa T., Sato T. and Koike M.** (1992) Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic suspension cultures of creeping bentgrass (*Agrostis palustris* Huds.) *Plant Cell Reports*, 11; 457-461.
- Toonen M., Hendriks T., Schmidt D., Verhoeven H., Kammen A. and Vries S.** (1994) Description of somatic-embryo-forming single cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking. *Planta*, 194; 565-572.
- Vasil V. and Vasil I.** (1981) Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Suspension Cultures of Pearl Millet (*Pennisetum americanum*), *Ann. Bot.* 47; 669-678.
- Vasil V. and Vasil K.** (1985) Plant Regeneration from Friable Embryogenic Callus and Cell Suspension Cultures of *Zea mays* L. *J. Plant Physiol.* 124; 399-408.

Vielteiz F., Ballester A. and Vieitez A. (1992) Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cell suspension cultures of *Fagus sylvatica* L. Plant Cell Reports, 11; 609-613.

De Vries S., Booij H., Meyerink P., Huisman G. and Wilde D. (1988) Acquisition of embryogenic potential in carrot cell-suspension cultures. Planta, 176; 196-204.

Wann S., Johnson M., Noland T. and Carlson J. (1987) Biochemical differences between embryogenic and nonembryogenic callus of *Picea abies* (L.) Karst. Plant Cell Reports, 6; 39-42.

Wilde H., Nelson W., Booij H., de Vries S. And Thomas T. (1988) Gene-expression programs in embryogenic and non-embryogenic carrot cultures. Planta, 176; 205-211.

Williams E. G. and Maheswaran G. (1986) Somatic Embryogenesis: Factors Influencing Coordinated Behavior of Cells as an Embryogenic Group. Ann. Bot. 57; 443-462.

Williams P., Wilkinson A., Lewis J., Black G. and Mavituna F. (1988) A method for the rapid production of fine plant cell suspension cultures. Plant Cell Reports, 7; 459-462.

Wilson G. (1980) Continuous Culture of Plant Cells Using the Chemostat Principle. In: Advances in Biochemical Engineering, Fiechter A (Ed); Vol. 16, Plant Cell Culture I, Ed. Springer Verlag, Berlin.

Witt H. J. (1992) UDP Glucose Metabolism During Differentiation and Dedifferentiation of *Riella helicophylla*. J. Plant Phys. 140 (3); 276 – 281.

Yeoman M. M. (1987) By-passing the Plant. Ann. Bot. 60; 157-174.

Zimmerman J. L. (1993) Somatic Embryogenesis: A model for Early Development in Higher Plants. The Plant Cell, 5; 1411 -1423.

CAPÍTULO 3

Cultivo Continuo

INTRODUCCIÓN AL CULTIVO CONTINUO

El cultivo de células, tanto procariotas como eucariotas, es un importante logro en los estudios de la biología. Sin embargo, la más importante contribución a la biología moderna ha sido poder cultivar las células *in vitro*. Las células se han cultivado de manera clásica en sistemas cerrados donde pueden ser cultivados lotes desde 50 µl hasta fermentadores industriales de 75,000 litros (Kreis y Reinhard, 1989). En esencia, su sistema de operación está compuesto por un medio de cultivo con los requerimientos nutricionales necesarios para las células y las condiciones ambientales óptimas de pH, agitación y temperatura. Se requiere de una densidad de inóculo pequeña y al final del tiempo de cultivo se puede obtener altos rendimientos de productos o biomasa.

Para situaciones industriales donde un tipo de célula o producto de interés está limitado por el tiempo de cultivo, se buscó una alternativa para hacer más eficientes los sistemas de producción. En Europa, a finales de la década de los 20, la industria desarrolló un sistema de cultivo continuo, donde las células se encuentran en una fase óptima de crecimiento. Este método de cultivo se realiza introduciendo medio fresco continuamente y obteniendo células y productos a una tasa constante a la salida del reactor. Hadden (1928), Mayer (1929), Rogers y Whittier (1930) fueron los primeros en contribuir con estos trabajos. En las décadas de los 30 y 40, se lograron grandes avances utilizando el sistema de cultivo continuo para la producción de ácido láctico, butanol, etanol, acetona y levaduras (Calcott, 1981).

Un área importante de estudio que se desarrolló con el cultivo continuo fue la de estudios analíticos utilizando modelos matemáticos para evaluar el crecimiento de bacterias. Los pioneros en esta área fueron Monod (1942) y Novick y Szilard (1950). Sus estudios estuvieron enfocados hacia la industria con el objetivo de incrementar la velocidad de multiplicación en los microorganismos. Monod propone que es posible fijar una velocidad de crecimiento desde un valor mínimo hasta un máximo, y que existe una relación entre la velocidad específica de multiplicación y la concentración de compuestos esenciales. Este sistema puede ser aplicado para todo tipo de células protistas y de suspensiones celulares homogéneas de animales o plantas (Bailey y Ollis, 1977).

En el año de 1950 se obtuvieron en la industria más avances para la obtención de antibióticos, toxinas y esteroides, así como para la producción de vacunas; usando el sistema de flujo continuo. En esta época la teoría del cultivo continuo se expandió hacia Checoslovaquia y Rusia. A finales de los años 50, esta teoría se comenzó a aplicar en Inglaterra, particularmente en la investigación de establecimientos

microbianos en el grupo de Porton Down. Posteriormente se desarrollaron trabajos en América del Norte, principalmente Estados Unidos y Canadá (Calcott, 1981).

TEORÍA DEL CULTIVO CONTINUO

En un cultivo continuo, la cantidad consumida de nutriente por las células es continuamente reemplazada por la entrada de un medio fresco a una velocidad constante. Con el objetivo de mantener constante el volumen del medio de cultivo en el reactor hay una salida de suspensión a la misma velocidad (Fig. 3.1). Bajo estas condiciones se puede establecer un estado estacionario, en donde no hay cambios en el volumen de medio de cultivo, la velocidad de multiplicación de las células permanece constante y la concentración del sustrato limitante se mantiene indefinidamente. Los parámetros de trabajo, como son el pH, la temperatura, velocidad de agitación, así como los efectos de la fuente de carbono, nitrógeno, fósforo o algún otro nutriente limitante, pueden ser monitoreados mientras que las células crecen a una velocidad determinada. Si uno de estos parámetros de trabajo se modifica y los demás permanecen constantes, el cambio que se produzca en el cultivo estudiado se deberá únicamente al efecto que ejerce este parámetro en dicho cultivo (Wilson 1980; Kurz y Constabel, 1981; Hoopen et al., 1992)

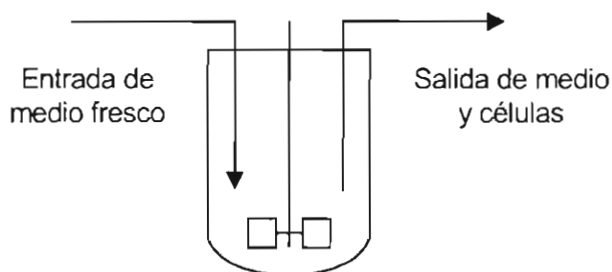


Figura 3.1. Esquema de un sistema de cultivo continuo.

En el cultivo continuo, la velocidad de crecimiento (μ), puede ser regulada por la concentración de un sustrato limitante. Esto a través de la velocidad de dilución (D), que puede ser calculada de la siguiente manera:

$$D = \frac{F}{V} \quad (1)$$

donde :

D = velocidad de dilución, (h^{-1})

V = volumen del medio, (L)

F = flujo de entrada de medio, ($\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$)

A partir de un tiempo t , el cultivo continuo puede comportarse de tres maneras diferentes, en función de la velocidad de dilución. Esta última está relacionada con la producción de biomasa (X) y la velocidad de multiplicación (Fig.3.2) (Pirt, 1975):

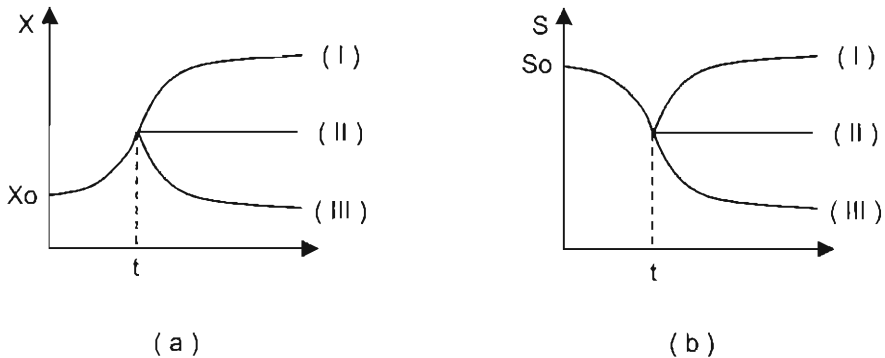


Figura 3.2. Comportamiento de la producción de biomasa X (a) y de la concentración de sustrato limitante S (b), en un cultivo continuo.

1. Cuando la velocidad de dilución es mayor a la velocidad de multiplicación,

$$D > \mu \quad (2)$$

donde:

$$\mu = \text{velocidad de multiplicación (h}^{-1}\text{)}$$

la concentración de biomasa disminuye. Como consecuencia podría ocurrir un lavado del reactor (Fig.3.2 aIII) y un exceso en la concentración del sustrato limitante (Fig. 3.2 bI). Esto implicaría llegar a una velocidad de dilución crítica (D_c), en la cual la concentración de la biomasa tiende a cero.

2. Existe un balance entre la velocidad de multiplicación y la velocidad de dilución lo que produce un estado estacionario.

$$D = \mu \quad (3)$$

Bajo estas condiciones la concentración de sustrato limitante permanece constante (Fig. 3.2 bII) al igual que la producción de biomasa (Fig. 3.2 aII).

3. Si la velocidad de dilución es menor a la velocidad de multiplicación:

$$D < \mu \quad (4)$$

hay un aumento de la concentración de biomasa (Fig. 3.2 aI) y la concentración de sustrato limitante disminuye hasta un mínimo (Fig. 3.2 bIII) (Pirt, 1975).

CLASIFICACIÓN DEL CULTIVO CONTINUO

Los sistemas de cultivo continuo se clasifican de acuerdo a la manera como se realiza la alimentación de medio fresco (constante o por intervalos) y por la forma en que se controla la salida (suspensión celular o medio de cultivo solamente).

Los sistemas en los cuales la biomasa es retenida y sólo la composición del medio es cambiada continuamente son llamados sistemas cerrados. Estos sistemas se encuentran clasificados como cultivo continuo cerrado y procesos de lote alimentado (fed batch). En estos sistemas el crecimiento es discontinuo y las condiciones del sistema no permanecen constantes.

Los sistemas en los cuales se tiene una salida de biomasa y medio de cultivo son llamados abiertos. En éstos, la velocidad de multiplicación y las condiciones de trabajo se mantienen constantes (Pirt, 1975; Kurz y Constabel, 1981; Wilson, 1980)

Sistema de cultivo continuo cerrado

Las células del cultivo son retenidas en el medio, mientras hay una entrada de medio fresco y se retira el equivalente de medio utilizado. Así, el número de células se incrementa continuamente mientras que el volumen de medio permanece constante. Sin embargo, la demanda nutricional de las células y la disponibilidad del oxígeno están eventualmente limitados por el factor de crecimiento. El sistema de cultivo continuo cerrado puede ser aplicado para estudios de los efectos de nutrientes o precursores metabólicos. Este sistema también permite cosechar productos extracelulares de manera constante (Kurz y Constabel, 1981).

Sistema de cultivo continuo abierto

En un cultivo continuo abierto la alimentación de medio fresco es continua y para mantener constante el volumen de cultivo hay una salida constante de suspensión, produciendo una condición de estado estacionario. Con este sistema es posible controlar la velocidad de crecimiento a través de la variación del flujo de medio. Una de las aplicaciones principales es estudiar el crecimiento de un cultivo a diferentes velocidades para seleccionar los estados apropiados de regulación metabólica y la producción de metabolitos secundarios. El cultivo continuo abierto se puede operar como un quimiostato, en el cual la velocidad de crecimiento y la densidad celular permanecen constantes a una velocidad de dilución dada, o como un turbidostato en el que la densidad celular es mantenida en un determinado nivel y el medio fresco es añadido intermitentemente para mantener esta densidad (Wilson, 1980; Kurz y Constabel, 1981).

Quimiostato

El quimiostato ha sido utilizado para el estudio del metabolismo celular ya que es un sistema en el cual es posible mantener el crecimiento celular en un estado estacionario por largos períodos. Esto se logra controlando la concentración de un nutriente limitante del crecimiento a través de la velocidad de dilución. Además este sistema no sólo permite estudiar el estado de crecimiento en la fase estacionaria sino también durante el período de transición de un estado estacionario a otro cuando ocurren cambios en la velocidad de dilución.

En este sistema la velocidad específica de multiplicación μ , está determinada por el equilibrio de nutrientes limitantes en el cultivo, lo cual puede ser expresado utilizando la ecuación de Monod (Pirt, 1975; Kurz y Constabel, 1981; Wilson 1980).

$$\mu = \mu_{max} \frac{[S]}{K_s + [S]} \quad (5)$$

Donde K_s es una constante de saturación que numéricamente es igual a la concentración del nutriente limitante cuando la velocidad de crecimiento específica se encuentra a la mitad de su valor máximo.

La velocidad máxima de crecimiento, μ_{max} , está determinada por:

$$\ln x = (\mu_{max} - D)t + \ln x_0 \quad (6)$$

donde:

x_0 = número de células al inicio del cultivo

x = número de células a un tiempo t .

Turbidostato

El Turbidostato se utiliza cuando se requiere trabajar con cultivos que crecen a baja densidad celular, con una velocidad de crecimiento cercana o igual a la velocidad máxima. En este sistema la densidad celular es monitoreada con ayuda de un turbidímetro. Para mantenerla constante, la velocidad de dilución es regulada por medio de la entrada y salida de medio (Pirt, 1975).

Su aplicación se ha orientado hacia los estudios de investigaciones en el consumo de nutrientes y metabolismo celular (Yamane, 1993).

Sistema de cultivo semicontinuo

En este tipo de cultivo parte del medio es removido a intervalos establecidos y reemplazado por una cantidad equivalente de medio fresco. El cultivo semicontinuo normalmente se ha empleado para mantener cultivos en la fase de crecimiento

exponencial por largos periodos, evitando la limitación de nutrientes. Este tipo de cultivo sirve también para obtener de manera constante material uniforme y puede ser utilizado para estudios metabólicos y fisiológicos (Kurz y Constabel, 1981; Wilson, 1980)

Sistema de cultivo por lote alimentado (fed-batch)

El término de cultivo por lote alimentado fue introducido por Yoshida y colaboradores en 1973, al referirse a un cultivo por lote con una alimentación continua de medio durante el curso del cultivo, evitando así el agotamiento de sustrato. En algunos casos se puede obtener casi el doble de rendimiento en la producción de biomasa en comparación con un cultivo por lotes (Yamane, 1993). El cultivo por lote alimentado puede trabajar de dos maneras:

- 1) En algunos casos hay una salida de medio, la cual es recuperada para la obtención de algún compuesto extracelular.
- 2) Parte del medio o suspensión es recuperada y otra parte es recirculada al sistema, bajo estas condiciones de trabajo se establece un sistema de retroalimentación.

El cultivo por lote alimentado se desarrolló empíricamente por algunas industrias de fermentación. Este sistema ha sido aplicado para la producción de penicilina, levadura para la panificación y para la disposición de desechos por fermentación (Yamane, 1993).

Existen ciertas características entre un cultivo por lote alimentado y un quimiostato que los hace ser diferentes. En el cultivo por lote alimentado hay una variación de volumen y se considera que se tiene un estado cuasiestacionario. En ambos casos se tiene que la velocidad de multiplicación es igual a la velocidad de dilución ($\mu = D$), pero en el cultivo por lote alimentado cuando la velocidad de dilución disminuye, la velocidad de multiplicación disminuye a la misma velocidad. A diferencia del quimiostato, dentro del cual el volumen del cultivo se mantiene constante y si la velocidad de dilución disminuye, la velocidad de multiplicación aumentará. (Pirt, 1975; Yamane, 1993).

APLICACIONES DEL CULTIVO CONTINUO

El cultivo continuo ha sido una herramienta de gran utilidad para estudios cuantitativos sobre la cinética de crecimiento y la producción de metabolitos. Esta información ha ayudado a diseñar equipos y predecir el curso de los procesos a gran escala. Entre sus aplicaciones se pueden citar los siguientes ejemplos:

- Realizar modelos matemáticos de la cinética de crecimiento (Satish y Jeewon, 1993).
- Proveer la información concerniente al papel del principal nutriente en el metabolismo y al control de la actividad metabólica. Además permite el estudio de

efectos de los parámetros físicos y químicos tales como pH, temperatura, agitación, mezclado y fase gaseosa, bajo condiciones ambientales controladas y constantes (Vienne y Marison, 1986). Se puede citar como ejemplos los trabajos de Roukas y Harvey (1988) quienes trabajaron con cultivos de *Aspergillus niger*, para evaluar el efecto del pH en la producción de ácido cítrico y glucónico en fermentaciones de melaza de betabel.

- Para la producción de metabolitos secundarios como la α -amilasa (Rutten y Daugulis, 1987) y la biosíntesis de antibióticos como la cepamicina (Rollins et al., 1988).
- Su aplicación ha ayudado a obtener altos rendimientos en procesos de fermentación para obtener etanol (Spinnler, 1986), ácido glucónico y sorbitol (Hyeon-Su y Hak-Sung, 1991), ácido acético (Aarnio et al., 1991).
- En la industria de los alimentos se ha aplicado para la producción de la salsa de soya (Takashi et al., 1991), para la producción de vinagre (Ghommidh et al., 1986) y la fermentación del jugo de manzana (Rutten and Daugulis, 1987).

Cultivo continuo de suspensiones celulares de plantas

Los primeros trabajos aplicando el cultivo continuo en suspensiones celulares de plantas fueron realizados por Tulecke y colaboradores en 1965. Cultivaron suspensiones celulares de rosas en un fitostato de 8 litros con medio de Murashige y Skoog (1962). Cosecharon cerca de un litro de suspensión con intervalos de uno a dos días de colecta, agregando la misma cantidad de volumen de medio fresco. En total realizó 7 corridas durante 232 días de cultivo, recuperando un total de 163 litros de suspensión celular, con un promedio de peso fresco de 112 g (4.6 g de peso seco) por litro, lo que equivale a un rendimiento de 0.42 g de peso seco por litro de suspensión por día, a una velocidad de dilución de 0.09 d⁻¹. La colecta de células fue de 3.4% de peso seco en promedio, del cual un 16% fue de proteína. El rango de proteína es de un 7% en células de lento crecimiento y de 19 % en cultivo de células jóvenes.

En 1968, Miller y colaboradores realizaron tres corridas en un fermentador de 15 litros cultivando suspensiones celulares de lechuga en un sistema de cultivo semicontinuo a 120 rpm. En cada experimento variaron la concentración de nutrientes y densidad de inóculo, manteniendo constante el volumen del medio de cultivo. La colecta se realizó cada 2 ó 3 días con un volumen de muestra de 1 a 2.5 litros de suspensión, reemplazando la misma cantidad con medio fresco. Obtuvieron un rendimiento del 8 al 19% de proteínas.

A partir de entonces diversos estudios se han realizado con células de plantas en cultivo continuo para estudios fisiológicos y en la biosíntesis de metabolitos secundarios (Kurz y Constabel, 1981).

En suspensiones celulares de plantas este método se ha utilizado como una herramienta para el estudio de los efectos ambientales, como son la temperatura y el

pH, sobre los cambios fisiológicos de la célula (Dougall et al., 1983a). Se han utilizado en estudios de crecimiento y rendimiento de suspensiones celulares bajo condiciones de exceso y limitación de nutrientes como fósforo, nitrógeno y carbono (Dougall et al., 1983b; Luuk et al., 1995; Veith y Komor, 1993; Oostdan y Van der Plas, 1996). También han servido para el estudio de los factores que afectan la formación de productos como son el estrés hidrodinámico, la velocidad de agitación y aireación (Smart y Fowler, 1981; Rokem y Goldberg, 1983). Se han realizado estudios relacionados con el efecto de la velocidad de dilución en la fijación biológica de nitrógeno en la simbiosis de *Phaseolus vulgaris*-*Rhizobium phaseoli* (León et al., 1987). Su aplicación ha sido exitosa en el cultivo de células fototrópicas (Hüsemann, 1983; Fischer et al., 1994) y para la producción de metabolitos secundarios a gran escala, como fenoles y alcaloides (Sahai y Shuler, 1984; Pareilleux y Vinas, 1984; Hoopen et al., 1992).

El sistema de cultivo continuo es ideal para obtener suspensiones celulares que se encuentran en un mismo estado de desarrollo durante todo el ciclo de cultivo. Se ha reportado que este sistema ha sido utilizado con éxito para cultivar suspensiones celulares de soya en sincronización, al inyectar un flujo de nitrógeno o etileno a intervalos regulares en un cultivo en quimiostato durante el estado estacionario (Kurz y Constabel, 1981).

BIBLIOGRAFÍA

Aarnio T. H., Suihko M. and Kauppinen V. (1991) Isolation of Acetic-Tolerant Baker's Yeast Variants in a Turbidostat. *Biotech. Appl. Biochem.*, 27; 55-63.

Bailey J. and Ollis D. (1977) Kinetics of Substrate Utilization, Product Yield and Biomass Production in Cell Cultures. In: *Biochemical Engineering Fundamentals*. 3334-3364, Ed. McGraw Hill, New York.

Calcott P. (1981) Continuous Culture: Where it came from and where it is now. In: *Continuous Culture of Cells*; 1-11; Ed. by Peter H., Phill D; CRC Press; Boca Raton, Florida.

Dougall D. K., Labrake S and Whitten G. H. (1983a) Growth and Anthocyanin Accumulation Rates of Carrot Suspension Cultures Grown with Excess Nutrients After Semicontinuous Culture with Different Limiting Nutrients at Several Dilution Rates, pH's and Temperatures. *Biotech. Bioeng.* 25, 581-594.

Dougall D. K., Labrake S. and Whitten G. H. (1983b) The effects of Limiting Nutrients, Dilution Rate, Culture pH and Temperature on the Yield Constant and Anthocyanin Accumulation of Carrot cells Grown in Semicontinuous Chemostat Cultures. *Biotech. Bioeng.* 25; 569-579.

Fischer U., Santore J., Hüsemann W., Barz W. and Alfermann A. (1994) Semicontinuous cultivation of photoautotrophic cell suspension cultures in a 20 L airlift-reactor. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 38; 123-134.

Ghommidh C., Cutayar J. and Navarro J. (1986) Continuous Production of Vinegar; I. Research Strategy; *Biotech. Lett.* 8, (1); 13-18.

Hadden E. C. (1928) Apparatus for obtaining continuous bacterial growth, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 21, 299.

Hoopen H., van Gulik W. and Heijnen J. (1992) Continuous Culture of Suspended Plant Cells, *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 28; 115-120.

Hüsemann W. (1983) Continuous Culture Growth of Photoautotrophic Cell Suspensions from *Chenopodium rubrum*. *Plant Cell Reports*, 2; 59-62.

Hyeon-Su R. and Hak-Sung K. (1991) Continuous production of gluconic acid and sorbitol from sucrose using invertase and oxidoreductase of *Zymomonas mobilis*. *Enzyme Microbiology Technology*, 13; 920-924.

Kreis W. and Reinhard E. (1989) The production of Secondary Metabolites by Plant Cells Cultivated in Bioreactors. *Planta Medica*. 55; 409-416.

Kurz W. and Constabel F. (1981) Continuous Culture of Plant Cells. In: Continuous Culture of Cells. Vol 2 , 141-157, CRC Press, Boca Raton, Florida.

León R. de, Castellanos M. and Rolz C. (1987) Effect of Dilution Rate on the Biological Nitrogen fixation in the *Phaseolus vulgaris* - *Rhizobium phaseoli* Symbiosis. Biotech. Lett., 9, (9); 665-670.

Luuk P., Gucht E. and van der Plas L. (1995) Growth Kinetics of Glucose-Limited *Petunia hybrida* Cells in Chemostat Cultures: Determination of Experimental Values for Growth and Maintenance Parameters. Biotech. Bioeng. 47; 42-52.

Novick A. and Szilard L. (1950) Experiments with the chemostat on spontaneous mutation of bacteria. Proc. Nat. Acad. Sci., 37,708.

Mayer H. V. (1929) A continuous method of culturing bacteria for chemical study. J. Bacteriol, 18; 59.

Miller R. A., Shyluk J., Gamborg O. And Kirkpatrick J. (1968) Phytostat for continuous culture and automatic sampling of plant cell suspensions. Science, 159, 540-544.

Monod J. (1942) Recherche sur la Croissance des Cultures Bacteriennes, Ed. Hermann and Cie, Paris.

Oostdan A. and van der Plas L. (1996). A cell suspension of *Linum flavum* (L.) in phosphate limited continuous culture. Plant Cell Reports, 16, 188-191.

Pareilleux A. and Vinas R. (1984) A study on the alkaloid production by resting cell suspensions of *Catharanthus roseus* in a continuous flow reactor. Appl. Microbiol Biotechnol. 19; 316-320.

Pirt J. (1975) Chemostat Culture. In: Principles of Microbe and Cell Cultivation. Chapter. 5, 29 - 56. Blackwell. Oxford.

Rogers L. A. and Whittier E. (1930) The growth of bacteria in continuous flow broth. J. Bacteriol, 20,126.

Rokem J. S. and Goldberg I. (1983) Factors Affecting Growth and Product Formation of Plant Cells Grown in Continuous Culture. Plant Cell Reports, 2, 219-222.

Rollins M., Jensen S., Wolfe S. and Westlake S. (1988) Dissolved Oxygen Control of a Maltose Feed to Batch Fermentations of *Streptomyces clavuligerus*: Effect on Cephamycin Biosynthesis. Biotech. Lett. 10 (4); 295 - 300.

Rutten R. and Daugulis A. (1987) Continuous Production of α -Amylase by *Bacillus amyloliquefaciens* in a Two-stage Fermentor. Biotech. Lett. 9 (7); 505-510.

Roukas T. and Harvey L. (1988) The effect of pH on Production of Citric Acid from Beet Molasses using Continuous Culture. *Biotech. Lett.* 10 (4); 289 –294.

Sahal O. P. and Shuler M. L. (1984) Multistage Continuous Culture to Examine Secondary Metabolite Formation in Plant Cells: Phenolics from *Nicotiana tabacum* Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXVI, pp.27- 36.

Satish J and Jeewon L (1993) Structure Analysis of Continuous Cultures Subject to Periodic Medium Tuning. *Chem. Eng. Sci.* 48 (17); 3007 –3035.

Smart N. and Fowler M. (1981) Effect of Aeration on Large-Scale Cultures of Plant Cells. *Biotech. Lett.* 3 (4), 171 –176.

Spinnler H. E. (1986) Hydrolysis of Cellulose in Fed-Batch Culture by *Cl. Thermocellum*: A way to increase speed of cellulose hydrolysis. *Biotech. Lett.* 8 (3); 213-218.

Takashi H., Sugishita M., Fukushima Y., Tersuro F. and Hiroshi M. (1991) Continuous Production of Soy Sauce by a Bioreactor System. *Process. Biochemistry*, 26, 39 –45.

Tulecke W., Taggaet R. and Colavito L. (1965) Continuous cultures of higher plant cells in liquid media. *Contr. Boyce Thompson Inst.*, 23, 33-46.

Veith R. and Komor E. (1993) Regulation of Growth, Sucrose Storage and Ion Content in Sugarcane Cells Measured with Suspension Cells in Continuous Culture Grown under Nitrogen, Phosphorus or Carbon Limitation, *J. Plant Physiol.* 142; 414– 424

Vienne P. and Marison I. W. (1986) Description of a System for the Continuous Cultivation of Plant Cells. In: *Secondary Metabolism in Plant Cell Culture*, Ed. Phillip Morris, Scragg A., Stafford A., Fowler M. Cambridge University Press. 195-201. New York.

Wilson G. (1980) Continuous Culture of Plant Cells Using the Chemostat Principle. In: *Advances in Biochemical Engineering*. Fiechter A. (Ed), vol. 16, Plant Cell Culture I, Ed. Springer Verlag, Berlin.

Yamane T. (1993) Application of an On-Line Turbidimeter for the Automation of Fed-Batch Cultures. *Biotech. Prog.* 9; 81-85.

CAPITULO 4

Estrategia Experimental

Para cumplir con los objetivos de esta tesis, la estrategia experimental se dividió en tres partes:

- A. Estudios de cinética de crecimiento de las células de *C. arabica* en matraz.
- B. Caracterización de la células en suspensión de *C. arabica*.
- C. Cultivo semicontinuo

A. Estudios de cinética de crecimiento de las células de *C. arabica*

Antes de iniciar los trabajos de cultivo semicontinuo, el primer paso para obtener información sobre el comportamiento de la línea celular en suspensión, es realizar cultivos por lotes en matraces y caracterizarla midiendo los parámetros que más influyen en su comportamiento.

Para conocer las características de la suspensión celular se desarrollaron estudios de cinética de crecimiento de las células de *C. arabica*. Con base a los resultados obtenidos podemos observar cuáles son los factores que influyen en el crecimiento de las células, entre los más importantes se encuentran el consumo de la fuente de carbono y los cambios de pH del medio, así como la relación entre los cambios de conductividad y la osmolaridad del medio de cultivo con respecto al incremento de biomasa. Los resultados obtenidos serán utilizados para establecer los ensayos de cultivo semicontinuo.

Análisis de datos

Los análisis para determinar la cinética de crecimiento en matraz, se realizaron por triplicado. Los resultados reportados son el promedio obtenido de las tres muestras.

Se utilizó el método de Person, para determinar la correlación entre la conductividad y la osmolaridad del medio de cultivo con relación al incremento del peso fresco, peso seco y volumen de paquete celular.

B. Caracterización de la células en suspensión de *C. arabica*

La suspensión celular de *C. arabica* se caracterizó por ser una suspensión heterogénea, es decir compuesta por diferentes tipos de células. Como segundo paso fue necesario clasificar las células en función a su morfología y observar su comportamiento durante los ciclos de cultivo, sobre todo las de tipo meristemático para establecer las condiciones de mantenimiento de la suspensión.

C. Cultivo semicontinuo

Después de conocer la evolución de los diferentes tipos de células en los cultivos por lote en matraces, se iniciaron los ensayos de cultivo continuo. Se tomaron en cuenta los datos obtenidos en los estudios de cinética de crecimiento en matraz, aunque se tuvo que probar un parámetro que no existe en el cultivo por lotes: la velocidad de dilución.

Determinación de la velocidad de dilución

Para encontrar la velocidad de dilución que se aproxime a la velocidad de multiplicación de las células de tipo meristemático, el flujo de entrada de medio fresco fue aumentado poco a poco hasta observar el mayor porcentaje de este tipo de células. Se tomaron muestras del flujo de salida de suspensión cada 6 horas y se midió el pH y el volumen de paquete celular. El número y porcentaje de células del tipo 1 (meristemático) fueron analizados cada 24 horas.

Evaluación de la velocidad de dilución seleccionada

Una vez establecida la velocidad de dilución con la cual se va a trabajar en el cultivo semicontinuo, se mantuvo constante, con el objeto de obtener una suspensión celular con el mayor porcentaje de células de tipo meristemático. El cultivo semicontinuo se inició con una suspensión de 7 días de cultivo.

Posibles factores que afectan al enriquecimiento en células de tipo meristemático

Se analizó el consumo de la sacarosa, fructosa y glucosa, y la concentración de reguladores de crecimiento (2,4-D y 6-BAP) durante el cultivo semicontinuo, como posibles factores para que las células dejaran de multiplicarse y se diferenciaron.

Enriquecimiento de las células de tipo 1 en cultivo semicontinuo

Se encontró que para poder mantener el mayor número de células de tipo 1 en cultivo semicontinuo, es necesario realizar lavados intermitentes de todo el medio de cultivo (cada 48 horas).

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de la suspensión celular

La suspensión celular de *C. arábica* se obtuvo según la metodología desarrollada en el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas de Cuba, por la Dra. Nancy Santana (1993) y adaptada en el Centro de Investigación Científica de Yucatán por el M.C. Javier Mijangos y colaboradores.

Los explantes se obtuvieron a partir de hojas de plantas de café provenientes de cafetales de Chiapas, de la siguiente manera: se seleccionaron las hojas en mejores condiciones, es decir aquellas que no se hayan dañado en el traslado del material o se hayan marchitado. Las hojas seleccionadas se lavaron dos veces con detergente y luego se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio comercial (aproximadamente al 6% de cloro libre) al 40 %, durante 20 minutos. Después se lavaron abundantemente en una solución estéril de cisteína (25 mg.l⁻¹) bajo condiciones estériles. Seguidamente, se cortaron en piezas de aproximadamente 1 cm², procurando de que en cada explante se encuentren las nervaduras secundarias de las hojas. Los bordes de la hoja y la nervadura central fueron desechados. Los explantes se cultivaron en un medio de inducción de callo (Tabla 1, anexo A), en cajas petri de 10 cm de diámetro, en obscuridad y a 27 °C ± 1 °C.

Después de 15 días se formó un callo friable, color amarillo claro, el cual fue colectado e inoculado en matraces de 125 ml con 40 ml de medio de inducción.

Mantenimiento de la suspensión

La suspensión celular se mantuvo en matraces de 125 ml con 40 ml de medio de cultivo y una densidad de inóculo del 2% (2g en peso fresco). Los matraces se mantuvieron en obscuridad, a 27 ± 1 °C, en un orbitador a 100 r.p.m. Los ciclos de resiembra fueron de 14 días.

Selección del tamaño adecuado de los agregados para el mantenimiento de las suspensiones

En la literatura se ha reportado que en suspensiones celulares de *C. arábica* la velocidad de crecimiento normalmente depende de la densidad de inóculo (Zamarripa et al, 1991) y que existe una relación entre el tamaño de agregados presentes en la suspensión y la velocidad de crecimiento. Se ha determinado que el crecimiento óptimo se obtiene con agregados de un tamaño entre 100 y 500 µm (Van Boxtel y Berthouly, 1996; Zamarripa et al, 1991). Por ello se decidió que las suspensiones fueran tamizadas con mallas que permitieran recuperar los agregados cuyo tamaño estuviese comprendido entre las medidas citadas anteriormente.

PARÁMETROS DE CRECIMIENTO

Número de células totales

Para el conteo de células totales en suspensión, se requirió la separación previa de las células que forman los agregados. Para ello se utilizó la técnica de maceración de células con una solución al 8% de trióxido de cromo (Street, 1977):

- En un tubo de ensaye se agregó 1 ml de suspensión y 2 ml de trióxido de cromo al 8%.
- La muestra se calentó a baño María a 70 °C durante 15 minutos (en una campana de extracción).
- Posteriormente el tubo se agitó durante 10 minutos en un vórtex.
- Para realizar la cuantificación de las células se utilizó una celda tipo Sedgewick Rafter S50, dividida en 100 cuadrantes con capacidad de 1 ml. Las muestras fueron observadas en un microscopio estándar marca Zeiss. Para realizar la cuantificación de las células se seleccionaron 10 cuadrantes al azar. Se utilizó la fórmula siguiente para el cálculo del número de células totales:

$$\frac{\text{Células totales}}{\text{ml de suspensión}} = \frac{\text{num. cel. totales} \times 3 \times 1000}{\text{num. cuadrantes cuantificados}} \quad (7)$$

Viabilidad

Para la determinación del porcentaje de viabilidad se tomó 1 ml de suspensión y se diluyó con 5 o 10 ml de medio (dependiendo del tiempo de cultivo de la suspensión). Posteriormente se tomaron 3 ml de muestra y se agregaron 30 µl de una solución de diacetato de fluoresceína (FDA) en acetona (5 mg.ml⁻¹). Para realizar la cuantificación de células se utilizó una celda tipo Sedgewick Rafter S50, dividida en 100 cuadrantes con capacidad de 1 ml. Las muestras fueron observadas en un invertoscopio marca Zenz con una lámpara de luz ultravioleta a una longitud de onda de 270 nm. Para realizar la cuantificación de las células se seleccionaron 10 cuadrantes al azar. Se utilizó la fórmula siguiente para el cálculo del número de células vivas:

$$\frac{\text{Células vivas}}{\text{ml de suspensión}} = \frac{\text{núm. cel. vivas} \times \text{factor de dilución} \times 1000}{\text{núm. de cuadrantes cuantificados}} \quad (8)$$

El número de células vivas se reportó como porcentaje de viabilidad:

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{\text{células vivas } ml^{-1}}{\text{células totales } ml^{-1}} \times 100 \quad (9)$$

Caracterización morfológica de las células

Para la caracterización morfológica sólo se tomaron en cuenta las células vivas, para ello se utilizó la técnica de viabilidad citada anteriormente. Para cuantificar el número de las células dependiendo a su morfología se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{células de tipo I vivas}}{ml \text{ de suspensión}} = \frac{\text{núm. cel. de tipo I vivas} \times \text{factor de dilución} \times 1000}{\text{núm. de cuadrantes cuantificados}} \quad (10)$$

El número de cada tipo de células se reportó como porcentaje:

$$\% \text{ células de tipo I} = \frac{\text{células de tipo I por ml}}{\text{células vivas por ml}} \times 100 \quad (11)$$

Peso fresco

Las muestras de las suspensiones se filtraron en papel filtro marca Altro y la materia fresca recolectada fue pesada en una balanza analítica. Las muestras fueron envueltas en papel aluminio (previamente pesado) y guardadas en el congelador para ser utilizadas en la determinación de peso seco (Hall, 1991).

Peso seco

Las muestras congeladas que se utilizaron para la determinación de peso fresco se liofilizaron a una temperatura de -50°C y una presión de 50 Torr durante 48 h. Al terminar el tiempo de liofilización se guardaron en un desecador durante 12 h. y posteriormente fueron pesadas (Hall, 1991).

Volumen de paquete celular

10 ml de suspensión celular se centrifugaron durante 10 min. a 1000 r.p.m. en tubos para centrifuga marca Corning de 14.5 ml de volumen. El volumen de paquete celular se expresó en porcentaje (Hall, 1991):

$$\% VPC = \frac{\text{vol. de paquete celular (ml)}}{\text{vol. de suspensión (ml)}} \times 100 \quad (12)$$

Conductividad del medio

La conductividad del medio clarificado después de la centrifugación, fue determinada con un conductímetro marca Cole-Parmer, modelo 4070 con un rango de 0 - 20 mS. El conductímetro fue previamente calibrado con agua destilada. El resultado se reportó en $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$.

pH del medio

El pH del medio clarificado después de la centrifugación, fue determinado con un potenciómetro marca Beckman, modelo pH 40 con compensador de temperatura.

Osmolaridad del medio

Para el análisis de la osmolaridad se tomaron 200 μl de medio de cultivo clarificado después de la centrifugación. Se utilizó un osmómetro marca ADVANCED modelo 3W2 previamente calibrado con soluciones estándar de NaCl de 100 y 500 $\text{mOsm/Kg H}_2\text{O}$. El resultado se reportó en $\text{mOsm/Kg H}_2\text{O}$.

Determinación semicuantitativa del consumo de azúcares

Para la determinación semicuantitativa del consumo de azúcares, se desarrolló un método por cromatografía en capa fina. Se utilizaron estándares de sacarosa, fructosa y glucosa para encontrar el sistema de elución óptimo, que fue el siguiente: acetonitrilo, acetona, ácido bórico al 0.5 % y agua destilada en una proporción 6:2.5:1:0.3. Se utilizaron cromatofolios de gel de sílice de 4 x 10 cm (marca Merck , tipo 60 F 254).

Los azúcares son revelados con la siguiente solución: 12 g de difenil amina, 12 g de hidrocloreto de anilina y 100 ml de ácido fosfórico en 1 litro de metanol.

Se tomaron 3 ml de medio de cultivo y se aforó a 25 ml con agua destilada. Las placas fueron divididas en carriles de 0.5 cm. de ancho. Con una micropipeta se aplicaron 0.5 μl de muestra y 0.5 μl de estándares de sacarosa, fructosa y glucosa al 0.5 % w/v en agua destilada.

Las placas aplicadas con las muestras y los estándares, se depositaron en una cámara previamente saturada con la fase móvil, dejando correr hasta 0.5 cm antes del borde superior de la placa. Las placas se corrieron dos veces para lograr una mejor separación de los compuestos. Después fueron secadas con una pistola de aire caliente y sumergidas en la solución reveladora por 3 seg. Con un

papel absorbente se elimina el exceso del revelador. Posteriormente las placas se secaron en la estufa a 110° C durante 15 min. Una vez reveladas las placas, se pudo observar la separación de los azúcares presentes en la muestra; al igual que los estándares. Los azúcares separados presentan un color característico, lo que facilita su identificación.

La distancia que recorren las sustancias aplicadas en las placas, está en función a la distancia que recorrió el disolvente durante el análisis, proporcionando una constante llamada R_f :

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por la sustancia (cm)}}{\text{distancia recorrida por el solvente (cm)}} \quad (13)$$

Cuadro 4.1. Características de los estándares utilizados en cromatografía de capafina para el análisis semicuantitativo de azúcares.

<i>Estándar</i>	<i>Distancia recorrida por el estándar (cm)</i>	<i>R_f</i>	<i>Color</i>
Fructosa	1.2	0.67	Naranja
Sacarosa	1.9	0.106	Violeta
Glucosa	2.5	0.138	Azul

Diseño y establecimiento del sistema de cultivo semicontinuo

Para establecer el sistema del cultivo semicontinuo se utilizó un matraz cilíndrico tipo Celstir de 250 ml, con dos salidas como se puede observar en la figura 4.1(A). La agitación del medio de cultivo se realiza por medio de un agitador magnético provisto de dos palas de teflón. La entrada del medio fresco y la salida de suspensión celular se realiza a través de los dos brazos del matraz, provistos de mangueras de silicón y tubos de vidrio. El flujo de entrada es controlado por una bomba peristáltica con velocidad variable 4.1(B). El flujo de salida es asegurado por otra bomba peristáltica de velocidad fija 4.1(C). El funcionamiento de las bombas peristálticas es controlado por un controlador lógico programable 4.1(D), que se encuentra conectado a una computadora. Se desarrolló un programa que permite controlar el tiempo de encendido de las bombas de manera intermitente y sincronizada. El ciclo inicia con el encendido de la bomba de entrada de medio durante 30 s. Esto permite introducir el volumen de medio deseado. Se apaga la bomba y se espera 4 minutos para que el medio del matraz sea homogeneizado. Al término de este periodo, se enciende la bomba de salida de suspensión durante 1 minuto. El tubo de aspiración de suspensión se encuentra a un nivel que permite mantener siempre un volumen de 250 ml de medio dentro del reactor. El ciclo se vuelve a repetir cada 6 horas. El programa fue realizado de manera modular lo que permite realizar cambios de cualquier

parámetro del ciclo y así poder controlar la velocidad de dilución. Después de la bomba de salida de suspensión del reactor, se instaló una desviación 4.1(E), para la toma de muestras.

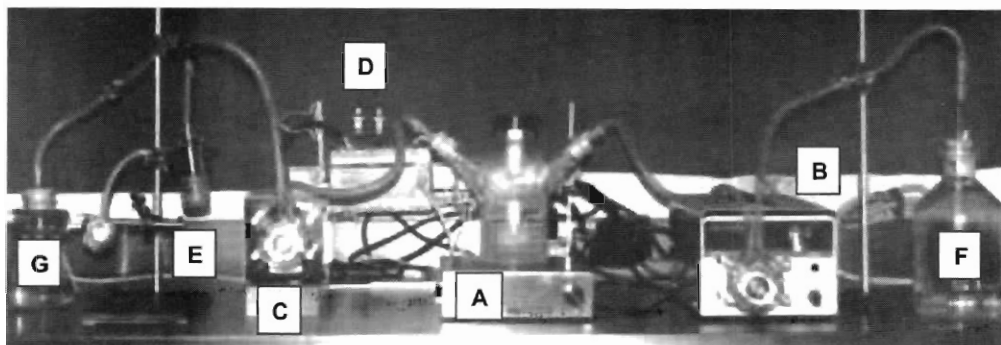


Figura 4.1. Sistema de cultivo semicontinuo. Donde: (A) matraz cilíndrico tipo Celstir, (B) bomba peristáltica con velocidad variable, (C) bomba peristáltica de velocidad fija, (D) controlador lógico programable, (E) desviación para la toma de muestras, (F) reservas de medio fresco, (G) matraz de colecta de la suspensión de salida.

Las reservas de medio fresco 4.1(F) y de suspensión de salida del reactor 4.1(G), están conectadas al sistema por conectadores rápidos que permiten el cambio de los matraces con bajo riesgo de contaminación. Ambas reservas estuvieron todo el tiempo al abrigo de la luz.

Para la toma de muestra se utilizó un mechero de alcohol, el cual fue suficiente para mantener estéril la zona de muestreo. La mayor probabilidad de contaminación se encuentra en el cambio de medio fresco y en el cambio del envase donde se recupera la salida de la suspensión. Se recomienda utilizar conectadores especiales para cada par de mangueras y de este modo facilitar los cambios de los envases.

BIBLIOGRAFIA

Hall R. D. (1991) The initiation and maintenance of plant cell suspension cultures. Plant Tissue Culture Manual A3; 1 – 21; Ed. by K. Lindsey, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

Santana N. (1993) Embriogénesis somática en el cultivo del cafeto (*Coffea spp.*). Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Tesis Doctoral.

Street H. E. (1977) Introduction to Plant Tissue and Cell Culture, 1–10 and 92 –97, Ed. Sci. Pub.; Oxford.

Van Boxtel J. And Berthouly M. (1996) High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. Plant Cell, Tiss Org. Cult; 44; 7-17.

Zamarripa A, Ducos J-P, Bollon H, Dufour M, and Pétiard V. (1991) Production d'Embryons Somatiques de Caféier en Milieu Liquide: Effets de Densité d'Inoculation et Renouvellement du Milieu. Café, Cacao, The ; (Paris); Vol. XXXV; (4); oct-déc, 233-243.

CAPÍTULO 5

Resultados y Discusión

CINETICA DE CRECIMIENTO EN MATRAZ

Consumo de la fuente de carbono

En el análisis semicuantitativo que se realizó por cromatografía en capa fina para determinar el consumo de la fuente de carbono en las suspensiones de *C. arabica*, se obtuvieron los siguientes resultados (Figura. 5.1):

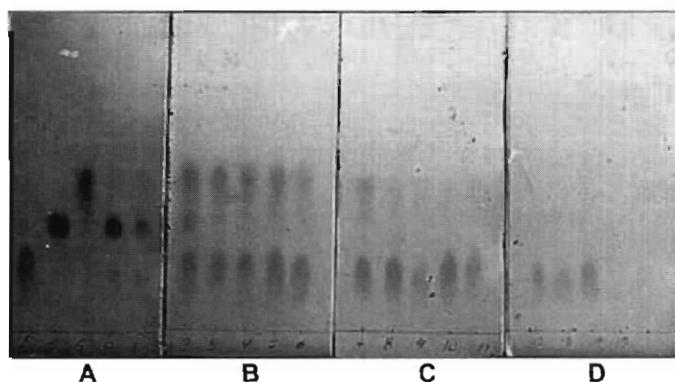


Figura 5.1. Análisis semicuantitativo del consumo de sacarosa, fructosa y glucosa, de una suspensión de *C. arabica*, por cromatografía en capa fina. Donde A) son los estándares de fructosa, sacarosa y glucosa. B),C) y D) son las muestras del medio durante 30 días de cultivo.

Las primeras tres aplicaciones corresponden a los estándares fructosa, sacarosa y glucosa, respectivamente. Además de la sacarosa, se pudo observar la presencia de glucosa y fructosa en el medio de cultivo desde el día 0 (Figura 5.1.A). Esto se debe a que el medio de cultivo se esteriliza en una autoclave a 121°C durante 20 minutos a 1 atmósfera de presión. Debido al calor, la sacarosa se hidroliza en glucosa y fructosa. Se ha comprobado que a la temperatura de esterilización, de un 15 a un 25 % de la sacarosa puede ser hidrolizada para dar glucosa y fructosa (Nadja et al., 1991).

Durante los primeros 4 días de cultivo, que corresponden a la fase de adaptación de la célula, éstas hidrolizan la sacarosa a fructosa y glucosa para su consumo (Figura 5.1.B). Una vez que la sacarosa está completamente hidrolizada,

las células empiezan a consumir la glucosa y su concentración va disminuyendo hasta que se agota en el medio de cultivo, esto sucede entre el día 6 y el día 22 de cultivo (Figuras 5.1.B y C). A partir del día 20 las células empiezan a consumir la fructosa debido a la baja concentración de glucosa en el medio de cultivo (Figura 5.1.C). La concentración de la fructosa va disminuyendo con el tiempo, a los 30 días de cultivo ya no se observa la presencia de glucosa y hay una concentración muy baja de fructosa (Figura 5.1.D.). Los resultados indican que el periodo de resiembra de las suspensiones puede ser de 14 días, antes del consumo total de la glucosa.

Los resultados obtenidos en el consumo de la fuente de carbono, nos indican que las células en suspensión de *C. arabica* utilizan preferentemente la glucosa como fuente de carbono. Cuando la glucosa se encuentra en concentraciones bajas en el medio de cultivo, las células, como una alternativa, utilizan la fructosa para su consumo. Este comportamiento del consumo de la fuente de carbono también fue observado en suspensiones celulares de *Catharanthus roseus* (Kyoko et al., 1989). Sin embargo, la velocidad del consumo de estos azúcares difiere entre las diferentes especies de plantas. Por ejemplo; en suspensiones de arroz, la glucosa y la fructosa son tomadas a la misma velocidad (Amino y Tazawa, 1988).

En suspensiones celulares de *Catharanthus roseus*, Kyoko et al. (1989), proponen las posibles rutas del metabolismo de la glucosa y la fructosa. Sugieren que la glucosa es preferentemente utilizada para la síntesis de almidón y celulosa, así como para la producción de CO₂ utilizado en la respiración de la célula. La fructosa preferentemente es utilizada para la síntesis de sacarosa, catalizada por la sucrosa sintasa, especialmente en la fase logarítmica de crecimiento

Variación del pH

Cuando el medio de cultivo es preparado, el pH del medio es llevado a 5.8. Después de su esterilización, el pH disminuyó a 5.35. A este pH se inocularon los matraces con células de *C. arabica*. Durante el ciclo de cultivo de 30 días se observaron cambios de pH, que oscilaban entre 4.5 y 5.25 como se muestra en la Figura 5.2.

En estudios realizados para evaluar el pH del medio de cultivo después de la esterilización, se ha reportado que existe una variación del mismo debido a las altas temperaturas. Estos cambios son menos pronunciados cuando se trata de medios semisólidos. Existen otros factores que influyen en el cambio de pH del medio como son el tipo del autoclave, la concentración de los nutrientes minerales, la calidad del agua usada en el medio y la duración del proceso de esterilizado.

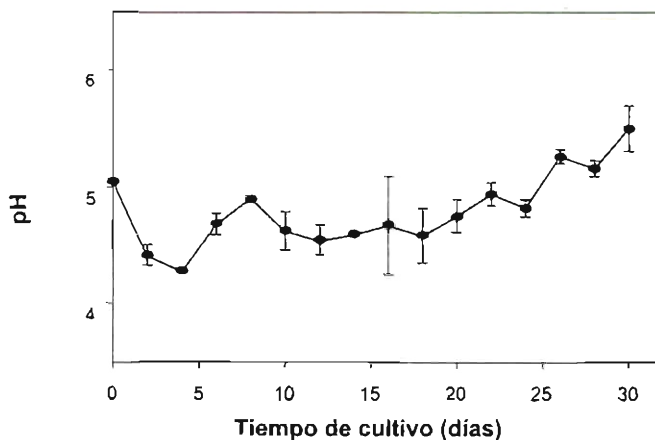


Figura 5.2. Variación del pH en suspensiones celulares de *C. arabica* en un ciclo de cultivo de 30 días, en matraces (n=3).

El pH inicial del medio puede influir en la velocidad a la que las células tomen el nitrato y el amonio del medio de cultivo (Dougall, 1980, citado por Skirvin et al. 1986). Así mismo se encuentra relacionado con la hidrólisis de la sacarosa en el medio, debido a que la disminución del pH acelera la hidrólisis de la sacarosa por la enzima invertasa que se encuentra unida a la pared celular y también es excretada al medio de cultivo. (Amino y Tazawa, 1988).

El pH del medio de cultivo en la suspensión celular de *C. arabica* sufre una disminución que va de 5.35 a 4.5 durante los primeros 4 días. En estos días se observa la disminución de la sacarosa (Figura 5.1.A) lo que indica que probablemente la enzima invertasa trabaja bajo estas condiciones de pH en este sistema. Este mismo valor de pH fue obtenido en suspensiones celulares de soja para la hidrólisis de sacarosa (Haldbrok y Kunhlen, 1972).

El valor de pH al cual trabaja la enzima invertasa no es una constante, difiere según la especie vegetal con la cual se trabaja. Por ejemplo, para suspensiones celulares de zanahoria su valor es de 4.7 (Kanabus et al. 1986), en el caso de suspensiones de arroz es de 4.0 (Amino y Tazawa, 1988), y para suspensiones de *Catharanthus roseus* el pH es de 4.2 (Kyoko et al., 1989).

En función a los análisis realizados, sería muy difícil determinar cuáles son los factores que causan el cambio de pH, ya que en cultivos por lote es muy difícil determinar si el cambio del pH es causa o efecto del cambio de alguna variable en el sistema, pues éste se encuentra cambiando continuamente durante todo el tiempo del cultivo. Sin embargo se han identificado algunos factores que

intervienen directamente en el cambio del pH, entre los que podemos citar los siguientes:

La forma de utilizar la fuente de nitrógeno por las células, la cual depende de la concentración total de nitrógeno y de la proporción entre el amonio, (NH_4^+) y el nitrato (NO_3^-). Los cambios observados varían acorde a la edad y genotipo del cultivo (Suzuki y Nata 1982 citados por Edwin 1993).

La toma de cationes y aniones altera el pH del medio. La reducción del nitrato a amonio es la mayor fuente de iones hidroxilo. Cuando hay un intercambio de iones hidroxilo por iones nitrato, el medio tiende a ser más alcalino. Cuando los iones de amonio son absorbidos por la célula, hay un intercambio de protones, y como consecuencia el medio tiende a ser más ácido (Skirvin et al. 1986).

Las auxinas son reguladores de crecimiento que promueven el crecimiento celular. Cuando en los medios de cultivo se utilizan auxinas, el medio tiende a ser más ácido. Esto puede ser proporcional a la concentración de auxinas, principalmente al 2,4-D. (Kurdjian et al, 1982).

Crecimiento celular

El crecimiento celular fue evaluado en función al incremento del peso seco, del peso fresco (Figura 5.3) y del volumen de paquete celular (Figura 5.4). El peso fresco inicial fue de 2 g.l^{-1} (densidad de inóculo inicial), que equivale a un peso seco de 0.65 g.l^{-1} y un volumen de paquete celular del 3%. El aumento del peso seco parece estabilizarse a los 15 días de cultivo, sin embargo, a los 20 días de cultivo se puede observar un aumento del peso seco hasta el final del ciclo de cultivo. En el peso fresco, este aumento es sostenido durante todo el cultivo. Lo mismo ocurre con el volumen de paquete celular.

En función a los resultados obtenidos en la cinética de crecimiento de las células en suspensión de *C. arabica* podemos observar las siguientes fases de crecimiento:

- a) una fase de adaptación durante los primeros 4 días de cultivo,
- b) una fase exponencial de crecimiento a partir del día 5. No se observó la fase estacionaria, ni la fase de declinación durante los 30 días de cultivo.

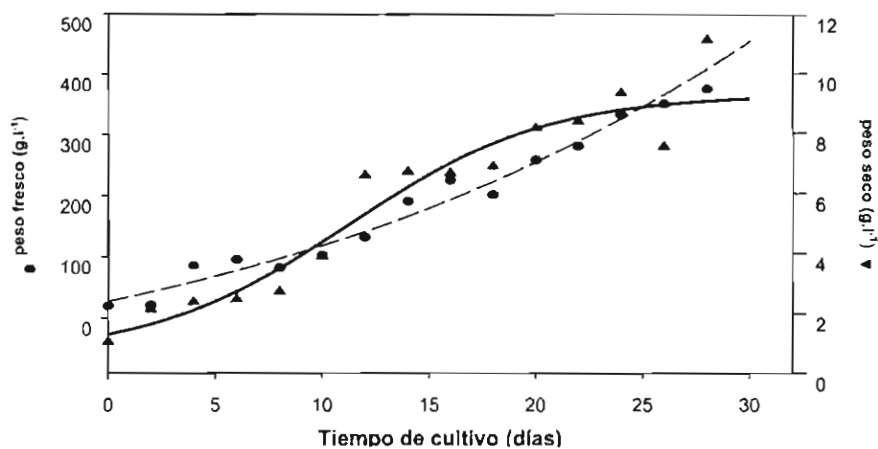


Figura 5.3. Variación del peso fresco (●) del peso seco (▲) en suspensiones celulares de *C. arabica* en un ciclo de cultivo de 30 días, en matraces.

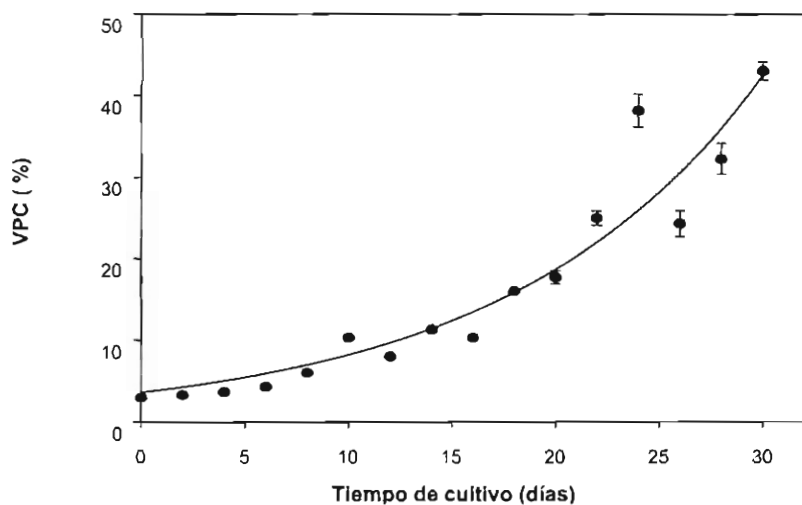


Figura 5.4. Variación del volumen de paquete celular en suspensiones celulares de *C. arabica* en un ciclo de cultivo de 30 días, en matraces (n=3).

Conductividad del medio de cultivo

Al analizar la conductividad de la suspensión de *C. arabica* se observó que disminuye con respecto al tiempo. La conductividad inicial es de 5.15 mS.cm^{-1} y va disminuyendo hasta llegar a 1.66 mS.cm^{-1} (Figura 5.5). Entre los días 22 y 26 se observa una disminución más acelerada de la conductividad del medio con relación a las primeras 3 semanas de cultivo. A partir de estos días se observa que el medio de cultivo cambia de incoloro a turbio.

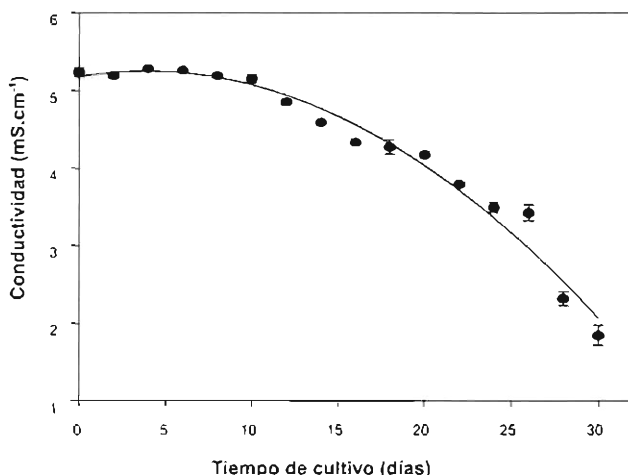


Figura 5.5. Variación de la conductividad en suspensiones celulares de *C. arabica* en un ciclo de cultivo de 30 días, en matraces ($n=3$).

Se ha demostrado que la conductividad del medio podría ser usada como una medida del crecimiento de suspensiones celulares de plantas (Taya et al., 1989). Esta técnica ya ha sido empleada con éxito en el cultivo de suspensiones celulares y raíces transformadas de *Atropa belladonna* y en agregados celulares de *Solanum aviculare*.

En algunos casos se propone que al aumentar la biomasa disminuye la conductividad. La disminución de la conductividad en un medio se puede atribuir a una disminución de iones inorgánicos que son tomados por la célula (Haldbrock y Kunhlen, 1972). Por ello, los valores obtenidos de peso fresco, peso seco, volumen de paquete celular y conductividad fueron analizados para determinar si hay una relación entre el incremento celular y la conductividad del medio de cultivo en la suspensión celular de *C. arabica*.

Los resultados obtenidos del coeficiente de correlación entre el peso fresco y la conductividad del medio de cultivo fue de 0.00000039 lo que indica que no hay relación entre estas dos variables. Sin embargo entre el incremento de peso seco y del volumen de paquete celular se obtuvieron coeficientes de correlación de –

0.917009 y -0.939218 respectivamente. Los valores negativos nos indican que mientras el peso seco y el volumen de paquete celular aumentan, la conductividad del medio disminuye.

Los resultados obtenidos indican que la conductividad se puede utilizar como un método simple para monitorear el crecimiento celular en la suspensión de *C. arabica*, tomando como base los resultados de volumen de paquete celular y peso seco.

Osmolaridad del medio de cultivo

La osmolaridad es considerada como el efecto que producen todos los compuestos presentes en el medio de cultivo en sus propiedades coligativas. Esta podría ser relacionada con el consumo de los nutrientes y ser utilizada para medir el efecto que pueden producir los azúcares en el medio. (Madhusudhan et al. 1995). La figura 5.6 presenta los resultados obtenidos en las mediciones de la osmolaridad del medio:

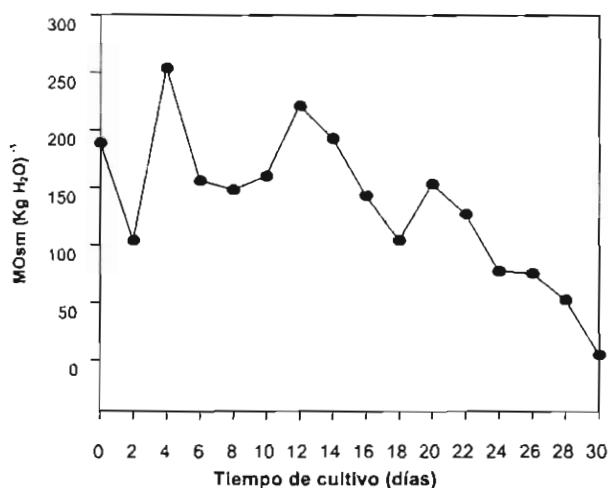


Figura 5.6. Variación de la osmolaridad en suspensiones celulares de *C. arabica* en un ciclo de cultivo de 30 días, en matraces.

La osmolaridad del medio al inicio del cultivo es igual a 198 mOsm/KgH₂O y disminuye hasta 100 mOsm/KgH₂O en el segundo día. Se puede observar que en el cuarto día de cultivo hay un aumento a 250 mOsm/KgH₂O. Este aumento podría deberse a la hidrólisis de la sacarosa en el medio de cultivo ya que el número de moléculas en el medio aumenta. En la figura 5.6 se observa el comportamiento de la osmolaridad durante el tiempo de cultivo.

Madhusudhan y colaboradores (1995), correlacionaron la osmolaridad del medio de cultivo con el crecimiento durante la fase exponencial de *Capsicum frutescens* y *Daucus carota*, cultivadas en medio nutritivo con sacarosa como fuente de carbono. En función a los resultados obtenidos consideraron la osmolaridad como un índice para la estimación de la concentración de biomasa.

La osmolaridad del medio de cultivo puede servir como un método de medición directa del crecimiento celular, sin embargo no es reproducible y confiable en todos los sistemas (Haldbrock y Kunhlen 1972; Taya et al. 1989; Kwok et al. 1992; Lusdorf et al. 1992). En el caso de la suspensión de *C. arabica*, se observó que durante el tiempo de cultivo la osmolaridad no disminuye en forma constante. Los resultados obtenidos de los coeficientes de correlación entre el peso seco, peso fresco y volumen de paquete celular y la osmolaridad del medio fueron de 0.00000649, 0.00000816 y 0.00004752 respectivamente. Esto indica que no hay una correlación directa para medir el crecimiento celular de la suspensión con la cual se trabajó tomando como parámetro la osmolaridad.

CARACTERISTICAS DE LAS CELULAS EN SUSPENSION DE *C. arabica*

Clasificación de las células en suspensión de *C. arabica*

La suspensión celular de *C. arabica* se caracterizó por tener una población heterogénea, bajo las condiciones en las que se trabajó, ya que estaba constituida por cuatro tipos de células. En función a su morfología, las células fueron clasificadas de la siguiente manera:

- **Tipo 1:** Células isodiamétricas con núcleo bien definido, se encuentran en división activa. Tienen un diámetro de 38.8 μm en promedio y crecen en agregados. Pocas veces se observan en forma individual (Figura 5.7.a).
- **Tipo 2:** Se caracterizan por ser células rectangulares, crecen en forma de cadena de 4 a 20 células o en agregados y tienen un tamaño de 36 x 40 μm (Figura 5.7.b).
- **Tipo 3:** Son células alargadas, semejantes a las del parenquima. Este tipo de células varía de tamaño. Se observaron células desde 68 μm hasta 103 μm de largo. Crecen en forma de cadenas de 2 a 3 células o en agregados de 237 x 276 μm . Ocasionalmente se observan en forma individual. Debido al tamaño del agregado se dificulta el conteo de este tipo de células. (Figura 5.7.c).
- **Tipo 4:** Este tipo de células son altamente vacuoladas. Crecen individualmente o en agregados de no más de 10 células. Se pueden observar células desde 67 x 96 μm hasta células de 86 x 96 μm (Figura 5.7.d).

De los 4 tipos de células, sólo las células del tipo 1 y 2 se dividen. Las células del tipo 1 se caracterizan por una división asimétrica. Tanto para suspensiones celulares como en callos de *C. arabica*, se considera que son las células de tipo meristemático, con potencial embriogénico (Michaux-Ferrière et al., 1987; Neuenschwander y Baumann, 1992).

Las células del tipo 2 han sido reportadas en suspensiones de trigo como células que presentan división longitudinal (Chung y Nguyen, 1990). Igualmente en suspensiones celulares de coníferas (Klimaszewska, 1989) y de zanahoria (Toonen et al. 1994). Se considera que este tipo de células presentan un bajo potencial embriogénico. En *C. arabica* no han sido reportadas con esta característica.

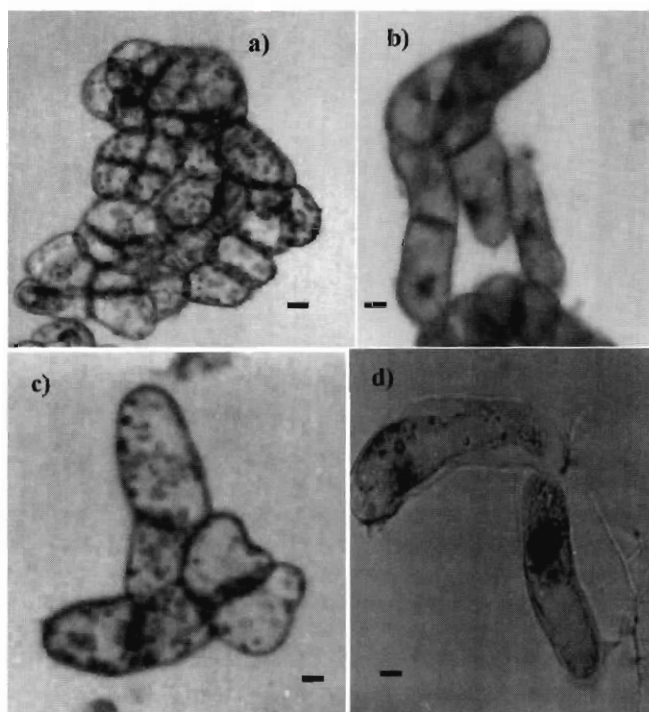


Figura 5.7. Células en suspensión de *C. arabica* teñidas con FDA: a) tipo 1; b) tipo 2; c) tipo 3 y d) tipo 4, la escala de la barra es de 10 μ m.

Las células alargadas y altamente vacuoladas (tipos 3 y 4) son células diferenciadas, las cuales no se multiplican (Michaux-Ferrière et al, 1987; Nomura y Komamine, 1985). Tanto para las suspensiones de *C. arabica* como en otras especies se consideran no embriogénicas.

En función a la clasificación realizada de las células en suspensión de *C. arabica*, el presente trabajo fue enfocado a la células de tipo 1, debido a que presentan la característica de células embriogénicas.

Selección del tamaño adecuado de los agregados para el mantenimiento de la suspensión de *C. arabica*.

Durante la realización de la cinética de crecimiento en matraces, se observó que el tamaño de los agregados de los cuatro tipos de células se incrementaba a lo largo del cultivo formándose agregados heterogéneos. Además se pudo constatar que existe una relación entre el tamaño del agregado y el tipo de célula presente en mayor proporción. En función a esta observación se consideró necesario para el mantenimiento de las suspensiones, seleccionar el tamaño de agregado que presente un mayor porcentaje de células de tipo 1.

- En la suspensión sin tamizar se observó la presencia de agregados grandes de células largas del tipo 3, células del tipo 4 altamente vacuoladas y muy poca presencia de células del tipo 1.
- En los agregados de 500 μm , se observaron principalmente células de los tipos 3 y 4.
- En los agregados entre 500 y 100 μm se observaron agregados con un mayor porcentaje de células del tipo 1.
- En los agregados de menos de 100 μm se observaron células del tipo 1 (no más de 20 células). También se encontraron células individualizadas de los tipos 1, 3 y 4 en muy baja proporción.

Con base en los resultados obtenidos se recomienda que las suspensiones celulares sean tamizadas antes de cada resiembra y recuperar los agregados que se encuentren entre 500 y 100 μm , debido a que en ellos se encuentra el mayor porcentaje de células de tipo 1. Este tamizado podría ayudar a mantener las suspensiones embriogénicas ya que se ha reportado que las suspensiones celulares de *C. arabica* pierden su potencial embriogénico gradualmente al ir aumentando el tamaño de sus agregados y el porcentaje de células vacuoladas grandes (Van Boxtel y Berthouly, 1996). Se considera que se podría mejorar el rendimiento de las suspensiones, ya que se ha reportado que en suspensiones de *C. arabica* existe una relación entre el tamaño de los agregados presentes en el inóculo y la velocidad de crecimiento (Dubuis et al, 1995; Noriega y Söndahl, 1993; Van Boxtel y Berthouly, 1995; Zamarripa et al., 1991).

Características de la suspensión de *C. arabica*

En la cinética de crecimiento se observó que las poblaciones de los diferentes tipos de células van variando con respecto al tiempo. Debido a esta observación se decidió analizar la variación del porcentaje de células del tipo 1 en la suspensión de *C. arabica* durante 14 días de cultivo, lo que corresponde al tiempo de resiembra de las suspensiones.

En la fase inicial del cultivo (fase lag), las células se están adaptando a un nuevo medio por lo que la división celular es baja. En *C. arabica* tiene lugar durante los primeros 4 días del cultivo. El número de células totales al inicio del cultivo fue de 140.95×10^3 células por ml de suspensión, de las cuales un 18.24 % pertenece a las células del tipo 1. (Figuras 5.8. y 5.9)

En el segundo día de cultivo se observa una disminución en el porcentaje de la viabilidad (Figura 5.8) y de células del tipo 1. Esta disminución podría ser debido a la muerte de células que no fueron capaces de adaptarse al nuevo medio.

Durante la fase de crecimiento exponencial (5 a 7 días después de la inoculación), el porcentaje de células del tipo 1 va en aumento, llegando a un máximo de 33.4% al día 6 de cultivo.

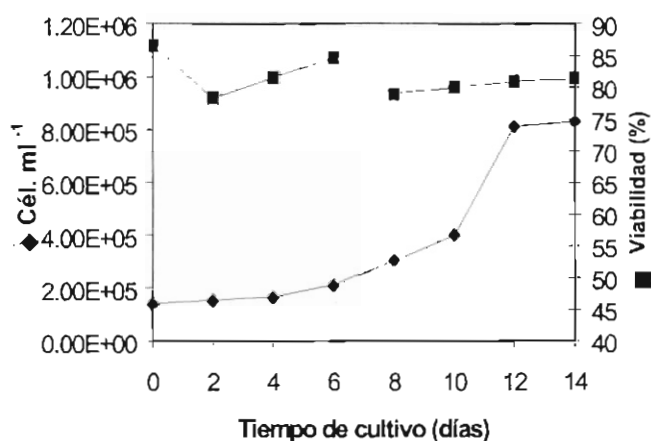


Figura 5.8. Número de células totales por mililitro (●) y porcentaje de viabilidad (■) de la suspensión de *C. arabica* durante 14 días de cultivo.

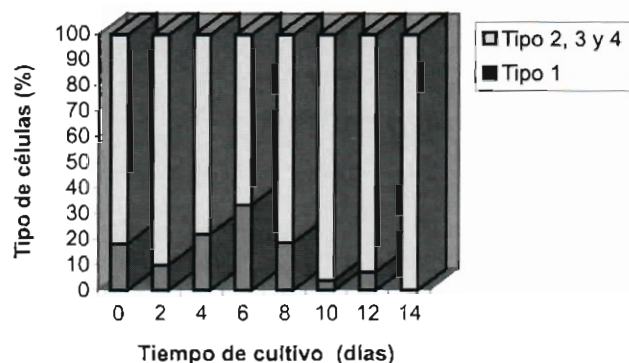


Figura 5.9. Variación del porcentaje de células de tipo 1, durante 14 días de cultivo de suspensiones celulares de *C. arabica*.

A partir del día 8, el crecimiento de las células se encuentra en la fase logarítmica y el porcentaje de células de tipo 1 comienza a disminuir. En el día 10 de cultivo, este tipo de células equivale a sólo un 7.15% del total de la población. En el día 14 ya no se observan agregados con células de tipo 1.

A pesar de que en la fase logarítmica se observa una disminución del número de células de tipo 1, las que tienen la característica de estar en constante división, podemos notar un incremento en el número de células totales.

En función a los resultados obtenidos en la caracterización de las células podemos concluir lo siguiente:

- Las células clasificadas de tipo 1, presentan mayor similitud a las células reportadas como embriogénicas, debido a sus características morfológicas y su división activa.
- Las células de tipo 1 se encuentran en mayor proporción en agregados celulares de entre 500 y 100 μm . El mayor porcentaje de este tipo de células se observa entre los días 5 y 7 de cultivo.
- El incremento de la población celular nos indica que las células de tipo 1 están presentes en la suspensión celular, sin embargo no son identificadas debido al tamaño de los agregados formados.
- En suspensiones de *C. arabica* se ha observado que las células meristemáticas al multiplicarse dan origen a una célula meristemática y a una célula diferenciada, (Söndahl et al. 1979). En algunos casos la diferenciación puede darse como un proceso que puede ocurrir en el curso normal del

desarrollo de algunas células, en respuesta a algún tipo de estímulo externo durante la madurez de la misma (Witt, 1992). Con base a lo anterior se podría explicar el enriquecimiento de la suspensión en células diferenciadas durante la fase logarítmica y el incremento de la población celular.

- Las células clasificadas como tipo 2 se encuentran en mayor porcentaje que los otros tres tipos de células presentes en la suspensión. Tienen la característica de presentar una división longitudinal, por lo que el incremento del número de células totales también se debe al incremento de células de este tipo.

No se encontraron en la literatura trabajos sobre el comportamiento de células en suspensión de *C. arabica* durante los ciclos de cultivo. Sin embargo, las observaciones realizadas con el comportamiento de las células son similares a los reportados por Chée y Cantliffe (1989) en estudios realizados con *Ipomea batatas* Poir. En su trabajo reportan un 20 % de agregados embriogénicos al inicio del cultivo, caracterizados por la presencia de células citoplasmáticas con división activa, presentes en agregados de entre 125 y 335 μm . Después de 27 días de cultivo sólo se observan agregados celulares no embriogénicos y células vacuoladas individuales. Para el mantenimiento de las suspensiones utilizan el procedimiento de tamizado en cada resiembra con el objeto de seleccionar el tamaño de agregados donde se encuentre el mayor porcentaje de células meristemáticas. Este procedimiento también es utilizado en suspensiones de *Zea mays* L. (Vasil y Vasil, 1985) e *Ipomea batatas* Poir (Bieniek et al., 1985)

CULTIVO SEMICONTINUO DE SUSPENSIONES CELULARES DE *C. Arabica*

Establecimiento del Cultivo Semicontinuo

Para poner a punto el equipo y probar el funcionamiento sincronizado de las bombas peristálticas, se realizó una corrida de 6 días de cultivo semicontinuo, operando como se indica en Materiales y Métodos. El matraz Celstir fue inoculado con una suspensión celular de *C. arabica* con 7 días de cultivo. En los experimentos de cinética en matraces se observó que en este tiempo es cuando se alcanza un mayor porcentaje de células del tipo 1.

Se utilizó una velocidad de dilución de $6 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$, que corresponde a un flujo de entrada de medio de 18 ml cada 12 horas, con el objetivo de que todo el medio de cultivo fuera cambiado del matraz en 7 días (esto equivale a realizar una resiembra cada 7 días).

Al inicio del cultivo semicontinuo el número de células totales por mililitro de suspensión fue de 99.8×10^3 , con un volumen de paquete celular de 1.38 % y un pH de 5.16. El número de células totales y el volumen de paquete celular fueron incrementado con respecto al tiempo (Figura 5.10). El pH se mantuvo constante

durante los primeros 4 días, a partir del día 5 comenzó a disminuir hasta llegar a un valor de 4.7.

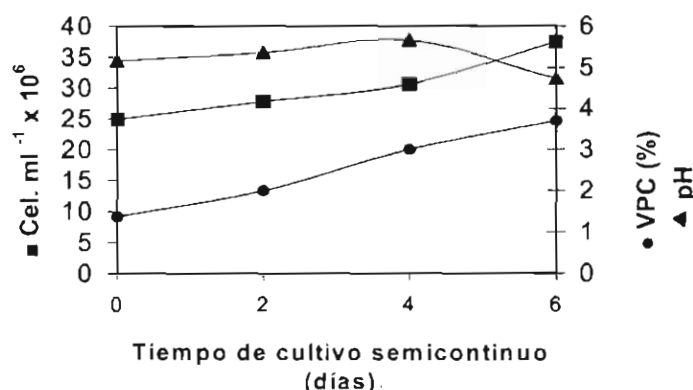


Figura 5.10. Variación del número de células totales (■), volumen de paquete celular (●) y pH (▲) con respecto al tiempo de suspensiones celulares de *C. arabica* en cultivo semicontinuo ($D = 0.006h^{-1}$).

Se observó que durante los primeros días de cultivo semicontinuo no hay presencia de la fase de adaptación como se presenta en las curvas de crecimiento realizadas en matraces.

Durante la corrida realizada no se observó contaminación en el equipo, ni en la suspensión celular. Todas las partes que forman el sistema trabajaron perfectamente por lo que se pasó a la siguiente etapa.

Determinación de la velocidad de dilución

Para seleccionar la velocidad de dilución a la cual se va a trabajar se requiere conocer la velocidad de multiplicación de las células en las condiciones en las que se va a establecer el sistema. El cultivo semicontinuo ha sido utilizado con microorganismos que a diferencia de las suspensiones celulares de plantas no presentan poblaciones heterogéneas, ni la formación de agregados, por lo que la velocidad de multiplicación puede ser seleccionada en función a las condiciones de trabajo. En el caso de la suspensión celular de *C. arabica* no se pudo determinar la velocidad de multiplicación debido a la heterogeneidad de su población celular. Como se mencionó en el capítulo 2, en las poblaciones heterogéneas cada tipo de célula se multiplica a diferentes velocidades. Además algunas células pasan por un proceso de diferenciación celular lo que hace aún más difícil la determinación de su velocidad de multiplicación. En el caso de las

células diferenciadas como son las células del tipo 3 y 4, éstas ya no se multiplican.

Una de las características de las células del tipo 1 (meristemáticas), es que se encuentran en división activa. Con base en esta característica se propone la siguiente hipótesis:

Si las células del tipo 1 se encuentran en división activa, entonces su velocidad de multiplicación es mayor a la velocidad de multiplicación de los otros tipos de células.

Si esta hipótesis es cierta, cuando la velocidad de dilución se aproxime o se iguale a la velocidad de multiplicación de las células del tipo 1, la suspensión celular se irá enriqueciendo en este tipo de células. Los otros tres tipos de células se irán eliminando con la salida de suspensión. Las células de tipo 2 no tendrán tiempo de multiplicarse y las células de tipo 3 y 4 como no se dividen serán desechadas del reactor.

El cultivo semicontinuo se inició después de 14 días de haber inoculado el matraz Celstir. Al inicio del cultivo, el volumen de paquete celular era igual al 25%. Se trabajó con una velocidad de dilución de $6 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$, equivalente a un flujo de entrada de medio de 9.23 ml cada 6 horas. La suspensión presentó agregados heterogéneos de más de 100 células, lo que hacía difícil la cuantificación e identificación de las mismas. El tamaño de los agregados fue disminuyendo con el transcurso del tiempo de cultivo.

Después de 3 días de cultivo semicontinuo, se observó la presencia de células del tipo 1, con un promedio de 15% del total del número de células. A partir de este tiempo la suspensión se caracteriza por la presencia de agregados heterogéneos de 10 a 30 células.

La velocidad de dilución se fue incrementando en promedio $1.6 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ cada 24 horas, lo que equivale a aumentar el flujo en 2.5 ml, hasta observar el mayor porcentaje de células de tipo 1. Durante el tiempo de cultivo el volumen de paquete celular disminuyó con el aumento de la velocidad de dilución. El pH varió de 4.8 a 4.3, y se mantuvo constante durante los últimos 5 días del cultivo (Figura 5.11).

A los 8 días de cultivo se llegó a una velocidad de dilución de 0.0146 h^{-1} , que equivale a un flujo de entrada de medio de 22 ml cada 6 horas, con un volumen de paquete celular del 4%. Se observó un 43.8% de células de tipo 1 (Figura 5.12), el cual fue el mayor porcentaje observado de este tipo de células, durante el tiempo de cultivo.

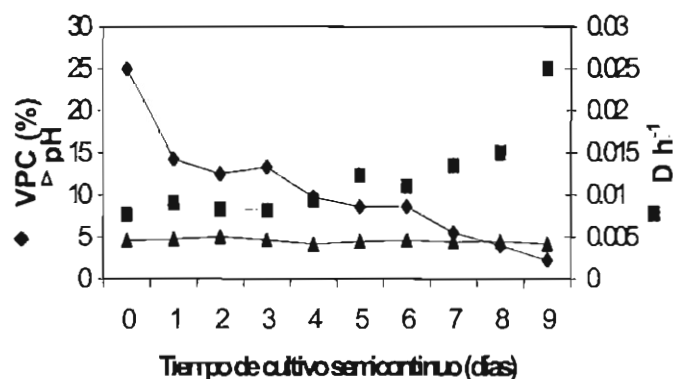


Figura 5.11. Variación del volumen de paquete celular (♦) y del pH (▲) con respecto a la velocidad de dilución (■) en cultivo semicontinuo.

A los 9 días de cultivo se llegó a una velocidad de dilución de 0.02 h^{-1} que corresponde a un flujo de 30 ml cada 6 horas. El volumen de paquete celular disminuyó a menos del 1%, observándose poca viabilidad en las células y un riesgo de eliminar todas las células del biorreactor.

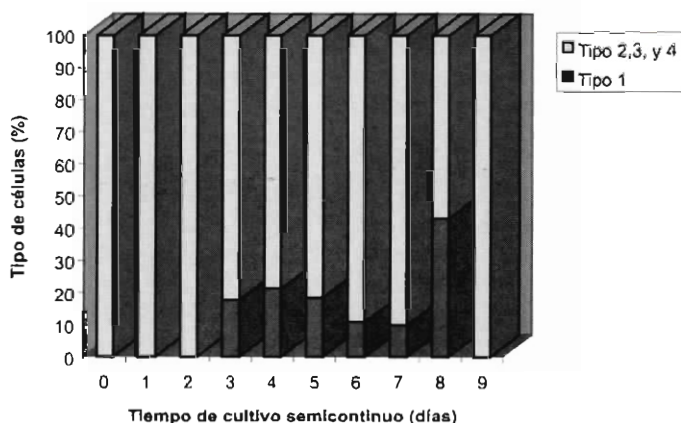


Figura 5.12. Variación del porcentaje de células en cultivo semicontinuo durante la determinación de la velocidad de dilución óptima.

En función a los resultados obtenidos al variar la velocidad de dilución, se puede concluir que la hipótesis propuesta para este experimento es correcta, ya que se pudo observar el enriquecimiento de la suspensión en células del tipo 1, lo que indica que éstas se están multiplicando a una velocidad mayor que los otros tipos de células.

En la literatura no se encontraron trabajos realizados en cultivo semicontinuo estudiando la variación del porcentaje del tipo de células con relación a la velocidad de dilución. Sin embargo podemos citar el trabajo de Vienne y colaboradores (1986), quienes trabajaron con un biorreactor tipo Airlift de 3.5 L, en cultivo continuo. Trabajaron con tres velocidades de dilución: 0.1, 0.25 y 0.28 d⁻¹. Estudiaron la distribución del tamaño del agregado con respecto al peso seco durante 65 días en suspensiones celulares de *C. roseus*. El cultivo continuo se inició a partir de 4 días después de la inoculación del biorreactor, con una velocidad de dilución inicial de 0.1 d⁻¹. La suspensión se caracterizó por la presencia de agregados de 40 hasta 600 µm.

En el primer día de cultivo continuo se encontraron agregados de 355 µm, el tamaño de los agregados fue disminuyendo al aumentar la velocidad de dilución. Este cambio favoreció la presencia de agregados entre 171 y 259 µm. A los 65 días de cultivo estos agregados se encontraban en mayor proporción con relación al peso seco. En este trabajo no se describe el tipo de células presentes en los agregados.

Cultivo semicontinuo con una velocidad de dilución constante

En el experimento anterior, al trabajar con una velocidad de dilución de 0.0146 h⁻¹, se observó el mayor porcentaje de células de tipo 1. Para determinar si esta velocidad de dilución era la óptima para mantener la suspensión celular de *C. arabica* en fase de crecimiento exponencial, con el mayor porcentaje de células del tipo 1, en el siguiente experimento la velocidad de dilución se mantuvo constante.

El cultivo semicontinuo se inició a los 14 días de inoculado el matraz Celstir con una suspensión celular de *C. arabica*. Bajo estas condiciones de cultivo se tenía un volumen de paquete celular de 6 % y un pH de 4.98 (Figura 5.13). Se observaron agregados heterogéneos con más de 100 células.

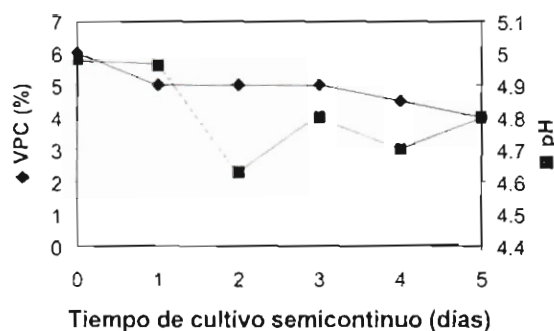


Figura 5.13. Variación del porcentaje de volumen de paquete celular (VPC) (♦) y del pH (■) en cultivo semicontinuo a velocidad de dilución constante.

A las 24 horas de cultivo, el volumen de paquete celular disminuyó a un 5%, manteniéndose constante durante tres días. La suspensión celular se caracterizaba por la presencia de agregados heterogéneos con células de los tipos 2, 3 y 4. Se observó la presencia de agregados homogéneos de células del tipo 1, con un promedio de 15 células por agregado y que correspondían a un 17.2% del total de células. Este porcentaje fue incrementando en el transcurso de las siguientes 24 horas, llegando a un máximo de 45.25% a los 2 días de cultivo semicontinuo (Figura 5.14).

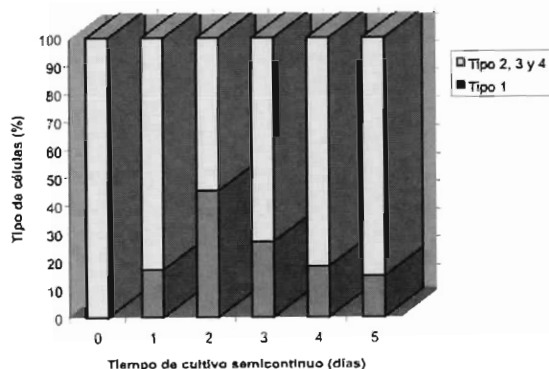


Figura 5.14. Variación del porcentaje de células en cultivo semicontinuo a velocidad de dilución constante.

Se había considerado que con la velocidad de dilución seleccionada se podría ir enriqueciendo la suspensión en células de tipo 1, hasta llegar a un máximo y mantenerlo constante. Sin embargo en los siguientes días de cultivo se observó que las células de tipo 1 dejaron de multiplicarse, para diferenciarse, dando origen a células vacuoladas (tipo 3). Al no haber incremento de células y al mantener la velocidad de dilución constante hubo una disminución del volumen de paquete celular debido al que el biorreactor se estaba lavando.

Debido a este evento, se consideró que el tiempo que se mantiene la suspensión antes de iniciar el cultivo semicontinuo no era el adecuado, ya que a los 14 días después de la inoculación, la suspensión celular se caracteriza por la presencia de agregados grandes compuestos en su mayoría de células diferenciadas (tipo 3 y 4).

Variación del tiempo de cultivo de la suspensión celular para establecer el cultivo semicontinuo

Con base en los resultados del experimento anterior, se decidió iniciar el cultivo semicontinuo al momento de inocular el matraz con una suspensión celular de *C. arabica* con 7 días de cultivo. Esto con el objetivo de tener el máximo porcentaje de células de tipo 1 desde el inicio del cultivo.

En este experimento se analizó el consumo de sacarosa, fructosa y glucosa por cromatografía en capa fina, para determinar si hay limitación en la fuente de carbono, considerando que este podría ser un motivo por el cual las células dejan de multiplicarse.

El cultivo semicontinuo se inició con una densidad de inóculo del 2% y un volumen de paquete celular del 3%. Las células de tipo 1 representaban el 47% del total de células y el medio tenía un pH de 5.5.

La velocidad de dilución seleccionada fue de 0.0117 h^{-1} , que corresponde a un flujo de 17.5 ml de medio cada 6 horas. No se utilizó la velocidad de dilución de 0.0146 h^{-1} , establecida en el experimento anterior, debido al bajo porcentaje en la densidad de inóculo, teniendo el riesgo de un lavado de las células en el biorreactor.

La velocidad de dilución seleccionada favoreció el enriquecimiento de células de tipo 1 durante el tiempo de cultivo, llegando a un máximo de este tipo de células de 76.74% a los 2 días (Figura 5.15), con un volumen de paquete celular de 1.5 % (Figura 5.16).

Sin embargo, el porcentaje de células de tipo 1 y el pH no se mantuvieron constantes. Se observó la misma respuesta que en el experimento anterior, las células dejaron de multiplicarse para vacuolizarse. A los 5 días de cultivo sólo se contaba con un 17.64 % de células de tipo 1. Como consecuencia, se observó una

disminución del volumen de paquete celular hasta llegar a 1%, debido a que las células diferenciadas, se iban eliminado con el flujo de salida.

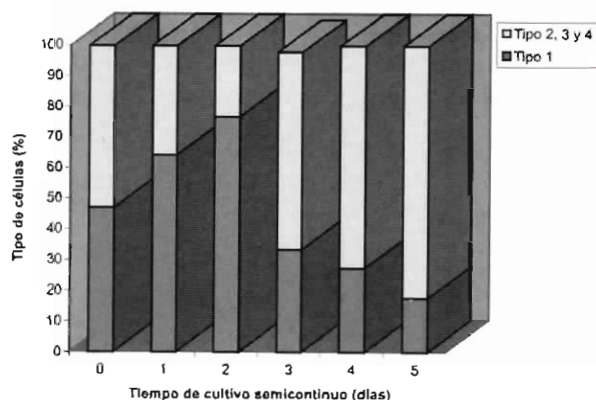


Figura 5.15. Variación del porcentaje de los tipos de células en suspensiones celulares de *C. arabica* en cultivo semicontinuo.

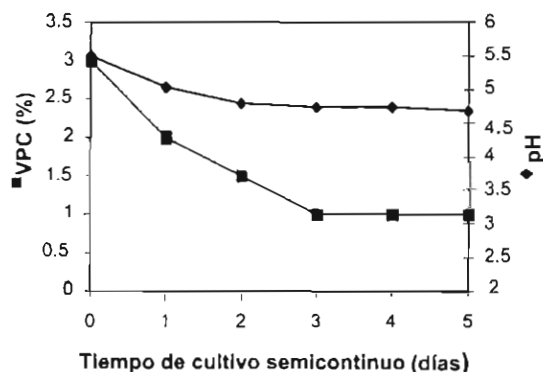


Figura 5.16. Variación del porcentaje de volumen de paquete celular (■) y pH (♦) en suspensiones celulares de *C. arabica* en cultivo semicontinuo.

En el análisis del consumo de la fuente de carbono, se observa durante los 5 días de cultivo la presencia de sacarosa, glucosa y fructosa (Figura 5.17). En el cultivo semicontinuo, los nutrientes que son consumidos por las células son reemplazados continuamente por la alimentación del medio fresco. Con base a estos resultados podemos descartar que la respuesta de las células de tipo 1 de dejar de multiplicarse sea debida al agotamiento de la fuente de carbono o de

algún otro nutriente, ya que también estos son restituidos por la alimentación de medio fresco.

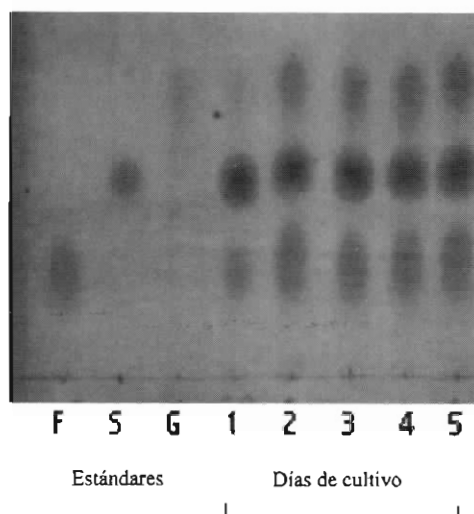


Figura 5.17. Análisis del consumo de la fuente de carbono en cultivo semicontinuo. F = fructosa; S = sacarosa; G = glucosa.

Disminución de la concentración de los reguladores de crecimiento en cultivo semicontinuo

Se considera que la concentración de 2,4-D en el medio de cultivo puede afectar la morfología de las células (Ho y Vasil, 1983). Estudios realizados sobre la inducción de callos de *C. arabica* con 2,4-D y ANA sugieren que el 2,4-D provoca la diferenciación celular prolongando el ciclo celular de ciertas poblaciones por la interferencia de uno o más puntos de control del ciclo celular, o debido a que se bloquean G1 o G2 (Söndahl y Sharp 1977; Söndahl et al., 1979).

En el siguiente experimento se disminuyó la concentración de 2,4-D y 6-BAP (1 y 0.33 mg.l⁻¹ respectivamente) en el medio de cultivo con que se alimentó al sistema. Esto con el objetivo de observar si la concentración de los reguladores de crecimiento está influyendo para que las células de tipo 1 tiendan a diferenciarse.

El pH inicial del medio de cultivo fue de 4.6, a diferencia del experimento anterior. En lugar de disminuir con respecto al tiempo de cultivo fue aumentando, llegando a 5:18 a los 6 días de cultivo semicontinuo. Se trabajó en promedio con un volumen de paquete celular de 1.5%. A los 4 días de cultivo, las células dejaron

de dividirse incrementando su volumen y dando origen a células vacuoladas (Figura 5.18).

A diferencia del experimento anterior, el enriquecimiento de células de tipo 1 fue más lento (Figura 5.19), llegando a un máximo de estas células a los 5 días de cultivo semicontinuo. Las células tuvieron el mismo comportamiento que en los experimentos anteriores. A los 4 días de cultivo se observaron células que vacuolizaron (tipo 4) y otras se diferenciaron a células alargadas (tipo 3).

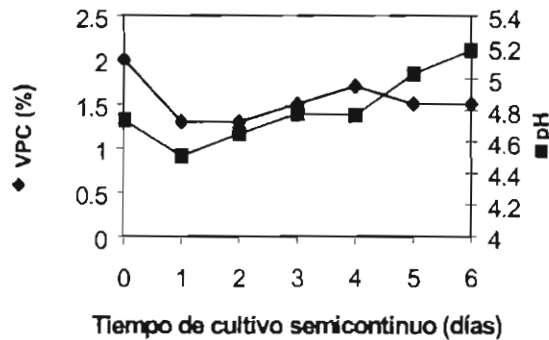


Figura 5.18. Comportamiento del volumen de paquete celular (■) del pH (◆) en cultivo semicontinuo con baja concentración de reguladores de crecimiento.

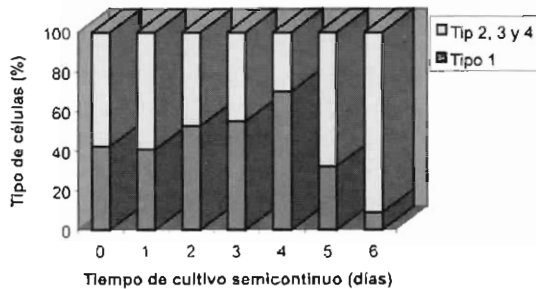


Figura 5.19. Variación del porcentaje de los diferentes tipos de células de suspensiones celulares de *C. arabica* en cultivo semicontinuo con baja concentración de reguladores de crecimiento.

Selección de células de tipo 1 en cultivo semicontinuo

Los experimentos anteriores permiten descartar la posibilidad de que las células de tipo 1 dejen de multiplicarse por agotamiento de nutrientes o por la alta concentración de reguladores de crecimiento. Por ello se sugiere la siguiente hipótesis: probablemente las células de tipo 1 estén liberando al medio un compuesto que inhiba su multiplicación, provocando que se detengan en alguna fase del ciclo celular y tiendan a diferenciarse y vacuolizar. Esto sucedería cuando en las suspensiones celulares se llega a un máximo de células de tipo 1.

Para comprobar esta hipótesis se realizó el siguiente experimento: cuando se llegó al máximo de células de tipo 1 en cultivo semicontinuo, se realizaron lavados del total del medio de cultivo, como se explica en Materiales y Métodos.

Se trabajó con una velocidad de dilución de 0.0117 h^{-1} , que corresponde a un flujo de 17.5 ml cada 6 horas. Al inicio del cultivo semicontinuo se contaron 124.5×10^3 células por ml de suspensión que equivalen a un 2% del volumen de paquete celular. Del total de células, un 41.7 % corresponde a las de tipo 1. El volumen de paquete celular disminuyó durante los dos primeros días. A partir del segundo, se llegó a un estado estacionario con 1% del volumen de paquete celular y se mantuvo constante hasta el octavo día de cultivo (Figura 5.20).

El pH inicial del medio de cultivo fue de 5.21. No se mantuvo constante durante todo el tiempo del cultivo, como se puede observar en la Figura 5.20.

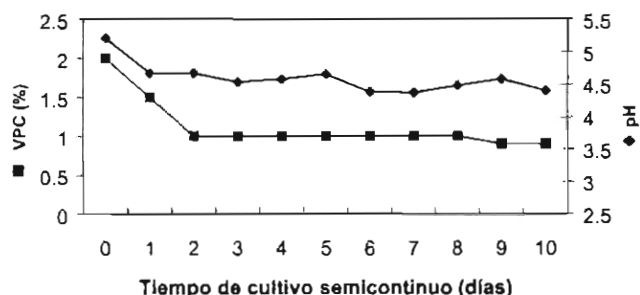


Figura 5.20. Variación del volumen de paquete celular (■) y pH (◆) de suspensiones celulares de *C. arabica* en cultivo semicontinuo con ciclos de cambio de medio.

El porcentaje de células de tipo 1 fue incrementando en cada ciclo de lavado, llegando a un máximo de 93.3 % a los 7 días de cultivo semicontinuo (Figura 5.21). En este momento ya se habían realizado tres ciclos de lavado del medio.

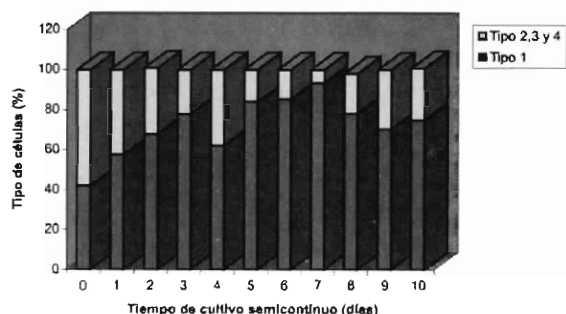


Figura 5.21. Incremento del porcentaje de células de tipo 1 de suspensiones celulares de *C. arabica* en cultivo semicontinuo con ciclos de cambio de medio.

A los 2 días de cultivo la suspensión celular se caracterizaba por la presencia de células de tipo 1 y 2 solamente. En promedio el número de células de tipo 1 por agregado era de 20 células. Las células de tipo 2 crecen en cadenas de no más de 10 células. Se observó que las células de tipo 1 al diferenciarse incrementan su volumen dando origen a células vacuoladas, de tipo 4. Las células de tipo 2 tienen un crecimiento longitudinal, al diferenciarse crecen hacia los extremos dando origen a células alargadas de tipo parenquimatoso, clasificadas en este trabajo como células de tipo 3.

A los 8 días de cultivo la suspensión celular se caracterizaba por el aumento de tamaño de los agregados de células de tipo 1, y por la presencia de agregados heterogéneos, con células de tipo 1 y células diferenciadas. Como consecuencia de la diferenciación celular, el volumen de paquete celular así como el número de células totales disminuyó a 0.9 % y 71.4×10^3 células por ml de suspensión, respectivamente.

El enriquecimiento de la suspensión en células de tipo 1, se logró después de 48 horas de cultivo, logrando un porcentaje máximo de 93% de células de este tipo y un promedio de 78 % durante 10 días.

En función a estos resultados podemos concluir que el cultivo semicontinuo es una buena herramienta para la selección de células de tipo meristemático, ya que no se requiere de tratamientos químicos que puedan provocar alguna alteración genética en las mismas. En el caso de métodos físicos, como es el tamizado de la suspensión se requiere de 2 a 5 meses para lograr obtener una suspensión homogénea (Acuña y Pena, 1991)

Con relación a la hipótesis propuesta en este experimento se considera que existe la posibilidad de que se encuentre algún compuesto que inhiba la multiplicación de las células meristemáticas, ya que al eliminar el medio de cultivo e inyectar medio nuevo las células continúan multiplicándose y en cada ciclo de

lavado se observa un aumento de células de tipo 1. Sin embargo, es necesario recalcar que este es el primer trabajo utilizando el cultivo continuo para el enriquecimiento de células meristemáticas, por tal motivo se tendrían que realizar más experimentos para la afirmación de esta hipótesis, así como realizar estudios con relación a los nutrientes presentes en el medio de cultivo.

En suspensiones celulares de betabel, se reporta que las células en suspensión al ser subcultivadas reinician su ciclo de división celular, debido a que experimentan un choque osmótico al incrementar las concentraciones de glucosa, nitrógeno y fósforo (Fowler et al., 1998). Al comparar con nuestros resultados se podría sugerir que las células experimentan un choque osmótico por el cambio de medio de cultivo, ya que cuando se realizan los cambios del medio en el biorreactor, lo que se está simulando, son subcultivos de 48 horas.

Velocidad de multiplicación de las células de tipo 1

Al obtener una suspensión casi homogénea de células de tipo tipo 1 (meristemático) podemos determinar su velocidad de multiplicación; si igualamos la velocidad de dilución utilizada para la selección de células de tipo 1 a 0.0117 h^{-1} , con la velocidad de multiplicación, es decir si:

$$\mu = D \quad (14)$$

Tenemos que la velocidad de multiplicación media de las células de tipo 1 bajo estas condiciones de trabajo es igual a 0.012 h^{-1} .

A partir de esta velocidad de multiplicación podemos obtener el tiempo de duplicación de las células:

$$t_d = \ln 2 / \mu \quad (15)$$

Por lo tanto el tiempo de duplicación de las células meristemáticas en la suspensión de *C. arabica* es igual a 57.76 h en cultivo semicontinuo.

BIBLIOGRAFÍA

- Acuña R. and Pena M.** (1991). Plant regeneration from protoplasts of embryogenic cell suspensions of *Coffea arabica* L. cv. Caturra. *Plant Cell Reports*, 10; 345-348.
- Amino S. and Tazawa M.** (1988) Uptake and Utilization of Sugar in Cultured Rice Cells. *Plant Cell Physiol*, 29 (3), 483 –487.
- Dubuis B., Oemer M. and Prenosil E.** (1995) Pilot-scale culture of *Coffea arabica* in a novel loop fluidized bed reactor. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*; 43; 171 - 183.
- Bieniek M., Harrell R., and Cantliffe D.** (1985) Enhancement of somatic embryogenesis of *Ipomoea batatas* in solid cultures and production of mature cultured somatic embryos in liquid cultures for application to a bioreactor production system. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*; 41 (1), 1-8.
- Chée R. And Cantliffe D.** (1989) Composition of embryogenic suspension cultures of *Ipomoea batatas* Poir and production of individualized embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 17, pp. 39-52.
- Chung W. and Nguyen H.** (1990) A novel approach for efficient plant regeneration from long-term suspension culture of wheat. *Plant Cell Reports*, 8, 639 - 642.
- Fowler M., Kirby M., Scott N., Slater A., and Elliott C.** (1998) Induction of cell division – related genes in quiescent (G_0). *Physiologia Plantarum* , 102, 61 – 70.
- George E.** (1993) *Plant Propagation by Tissue Culture, Part 1, The Technology*, Chapter 9, Ed. Exegetics Ltd.; Edington.
- Haldbrock K. and Kunhlen E.** (1972) Relationship between Growth of Parsley and Soybean Cells in Suspension Cultures and Changes in the Conductivity of the Culture Medium. *Planta*, 108, 271 – 278.
- Hall R.** (1991) The initiation and maintenance of plant cell suspension cultures. *Plant Tissue Culture Manual*, A3, 1-21. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- Hew C. and Ting C..** (1988) Substrate utilization by Dendrobium Tissues. *Bot. Gaz*, 149 (2), 153-157.
- Ho W-J. and Vasil K.** (1983) Somatic Embryogenesis in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.): Growth and Plant Regeneration from Embryogenic Cell Suspension Cultures. *Annals of Botany*, 51, 719 - 726.
- Kanabus J., Bresan R. and Vcarpita N.** (1986) Carbon Assimilation in Carrot Cells in Liquid Culture. *Plant Physiol.* 82, 363 -368.

Kyoko S., Kubota K., and Hidroschi A. (1989) Uptake and Metabolism of sugar by Suspension Cultured *Catharanthus roseus* Cells. *Annals of Botany*, 64, 185-194

Klimaszewska K. (1989) Recovery of somatic embryos and plantlets from protoplast cultures of *Larix x eurolepis*. *Plant Cell Reports*, 8, 440-444.

Kurdjian A., Mathieu Y., and Gun J. (1982) Evidence for an action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the vacuolar pH of *Acer pseudoplatanus* cells in suspension culture. *Plant Sci. Lett.*, 27, 77-86.

Kwok K., Tsoulpha P. and Doran P. (1992) Limitations associated with conductivity measurement for monitoring growth in plant tissue culture. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 29, 93 -99.

Lusdorf M., Tactorus T. E., and Kikeo S. (1992) Growth parameters of Embryogenic suspension cultures of interior spruce (*Picea glauca*) and (*Picea mariana* Mill). *Plant Science*, 82 (2), 227-234.

Madhusudhan R., Rao R., and Ravishankar A. (1995) Osmolarity as a measure of growth of plant cells in suspension cultures. *Enzyme and Microbial Tech.*; 17, 989 - 991.

Martin S. M. and Rose D. (1976) Growth of Plant Cell (*Ipomea batatas*) Suspension Cultures at Controlled pH levels. *Can. J. Bot.*, 54. 1264-1270.

Michaux-Ferrière N., Dublin P. and Schwendiman J. (1987) Étude histologique de L'Embryogenèse somatique à partir d'explants foliaires de *Coffea arabica* L. *Café Cacao Thé* (Paris); vol. XXXI; avril-juin; 103-110.

Mills D. and Lee J. (1996) A simple, accurate method for determining wet and dry weight concentrations of plant cell suspension cultures using microcentrifuge tubes. *Plant Cell Reports* 15, 634-636.

Nadja S., Ke-Cheng H., and Bornman C. (1991) Avoidance of precipitation and carbohydrate breakdown in autoclaved plant tissue culture media. *Plant Cell Reports*, 10, 115 -119.

Neuenschwander B. and Baumann T. (1992) A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Plant Cell Reports*, 10, 608-612.

Nomura K. y Komamine A. (1985) Identification and Isolation of Single Cells that Produce Somatic Embryos at a High Frequency in a Carrot Suspension Culture. *Plant Physiol*, 79, 988-991.

Noriega C. and Söndahl M. (1993) Arabica Coffee Micropropagation Through Somatic Embryogenesis via Bioreactors. ASIC, 15^e Colloque, Montpellier, 73-81.

Rashid A. (1988) Cell Physiology and Genetics of Higher Plants, Vol. 1, Ed. CRR. Florida.

Skirvin R., Chu M., Mann M., Heather Y., Sullivan J. and Fermanian T. (1986) Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time and cultured plant material. Plant Cell Reports; 5; 292- 294.

Söndahl M. and Sharp W. (1977) High Frequency Induction of Somatic Embryos in Cultured Leaf Explants of *Coffea arabica* L.; Z. Pflanzenphysiol, 81; 595-408.

Söndahl M., Salisbury J. L., and Sharp W. (1979) SEM Characterization of Embryogenic Tissue and Globular Embryos During High Frequency Somatic Embryogenesis in Coffee Callus Cells ; Z. Pflanzenphysiol, 94, 185-188.

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

Toonen M, Hendriks T, Schmidt D, Verhoeven H, Kammen A and Vries S. (1994) Description of somatic-embryo-forming single cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking. Planta, 194, 565-572.

Van Boxtel J. and Berthouly M. (1996) High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. Plant Cell, Tiss. Org. Cult., 44, 7-17.

Vasil V. and Vasil K. (1985) Plant Regeneration from Friable Embryogenic Callus and Cell Suspension Cultures of *Zea mays* L. J. Plant Physiol, Vol. 124, 399-408.

Witt H. J. (1992) UDP Glucose Metabolism During Differentiation and Dedifferentiation of *Riella helicophylla*. J. Plant Phys. 140 (3); 276 – 281.

Zamarripa A., Ducos J., Bollon H., Dufour M. and Pétiard V. (1991) Production D'Embryons Somatiques de Caféier en Milieu Liquide: Effets de Densité D'Inoculation et Renouvellement du Milieu. Café, Cacao, Thé, (Paris); Vol. XXXV; 4; oct-déc. 233-243.

CAPÍTULO 6

Conclusiones y Perspectivas.

CONCLUSIONES

Al lograr establecer el cultivo semicontinuo para el enriquecimiento de la suspensión en células meristemáticas (tipo 1) se cumple el objetivo de este trabajo. Con base a los resultados obtenidos se pueden establecer las siguientes conclusiones:

1. La conductividad del medio de cultivo puede servir como un indicador confiable y rápido para monitorear el crecimiento celular en suspensiones de *C. arabica*.
2. La suspensión celular de *C. arabica* presenta una población celular heterogenea bajo las condiciones a las que se trabajó. Se caracterizó por presentar células isodiamétricas (tipo 1) que al diferenciarse dan origen a células altamente vacuoladas (tipo 4) y de células que crecen en cadena (tipo 2) que al diferenciarse dan origen a células alargadas y vacuoladas (tipo 3). Las células de tipo 1 tienen una mayor velocidad de multiplicación que las células de tipo 2. Las células de tipo 3 y 4 ya no se multiplican.
3. El equipo diseñado para establecer el cultivo semicontinuo arrojó resultados satisfactorios. Permitió mantener la suspensión en condiciones estériles, se puede tomar muestras con bajo riesgo de contaminación, permite realizar cambios de los recipientes donde se encuentran el medio de cultivo y el de recuperación de la suspensión. El sistema es controlado por medio de un controlador lógico programable y la velocidad de dilución puede ser ajustada de acuerdo a las necesidades del cultivo.
4. El cultivo semicontinuo es una buena herramienta para la obtención de suspensiones homogéneas, ya que no requiere de tratamientos químicos que puedan provocar alguna alteración genética en las células. En el caso de métodos físicos se requiere de 2 a 5 meses para lograr este objetivo. En el cultivo semicontinuo de la suspensión celular de *C. arabica* se logró el enriquecimiento en células meristemáticas después de 48 horas de cultivo, logrando un porcentaje máximo de 93% de este tipo de células y un promedio de 78% durante 10 días.
5. Las condiciones de operación del cultivo semicontinuo permitieron establecer dos velocidades de dilución teniendo en cuenta la densidad de inóculo:
 - Para una suspensión con 14 días de cultivo y con un volumen de paquete celular de 6% se estableció que la velocidad de dilución óptima es de $0.88h^{-1}$ equivalente a un flujo de 22 ml cada 6 horas.

- Para una suspensión con 7 días de cultivo con una densidad de inóculo del 2% se requiere una velocidad de dilución de 0.72h^{-1} que corresponde a un flujo de 18 ml cada 6 horas.

PERSPECTIVAS

Este es el primer trabajo con suspensiones celulares de plantas utilizando el cultivo semicontinuo como una herramienta para la selección de células meristemáticas durante la fase de mantenimiento de la suspensión. Una segunda etapa sería la utilización de esta suspensión enriquecida para realizar estudios sobre embriogénesis somática en medio líquido tales como la pérdida del potencial embriogénico de dichas suspensiones y su mantenimiento entre los aspectos más importantes de este proceso.

Para mantener un alto porcentaje de células meristemáticas por más de 10 días, se requiere realizar estudios sobre la diferenciación celular y los factores que originan este proceso.

El equipo diseñado no sólo sirve para el enriquecimiento de células meristemáticas. Su aplicación puede ser tan diversa según sean las necesidades del análisis en el experimento. En este sistema se podrían realizar estudios más finos de cinética de crecimiento y regulación metabólica.

Otra ventaja del equipo diseñado es su bajo costo. Se puede implementar en cualquier laboratorio sin la necesidad de instalaciones especiales. Este equipo podría tener modificaciones que lo hicieran más completo, por ejemplo adicionarle electrodos de pH, temperatura, conductividad y poder monitorear estos parámetros con ayuda de una computadora.

ANEXO 1

Medio Murashige y Skoog (1962)

<i>Micronutrientes</i>	<i>μM</i>	<i>mg L⁻¹</i>
KI	5	0.83
H ₃ BO ₃	100	6.2
MnSO ₄ ·4H ₂ O	100	22.3
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	29.9	8.6
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.1	0.03
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.1	0.03
Na ₂ EDTA	100	37.23
FeSO ₄ ·7H ₂ O	100	27.95

<i>Macronutrientes</i>	<i>μM</i>	<i>mg L⁻¹</i>
NH ₄ NO ₃	20.6	1650
KNO ₃	18.8	1900
CaCl ₂ ·2H ₂ O	3	400
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.5	370
KH ₂ PO ₄	1.25	170

<i>Constituyentes Orgánicos</i>	<i>μM</i>	<i>mg L⁻¹</i>
Inositol	555.1	100
Acido nicotínico	4.06	0.5
Piridoxina.HCl	2.43	0.5
Tiamina.HCl	0.3	0.1
Glicina	26.6	2
Sacarosa		30,000



CICY

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A.C.