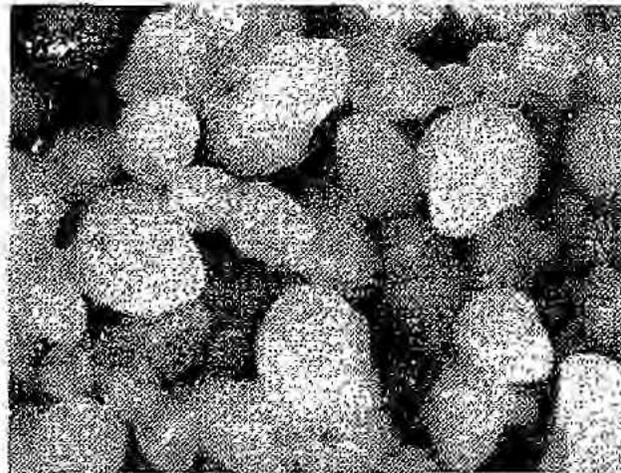


1^{ER} CURSO INTERNACIONAL DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN ESPECIES TROPICALES

Manual de Clases Prácticas



Instituto de Biotecnología de las Plantas
27 de septiembre al 8 de octubre de 2004
Santa Clara
Cuba



**1^{er} CURSO INTERNACIONAL DE EMBRIOGÉNESIS
SOMÁTICA EN ESPECIES TROPICALES**
Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP)
27 de Septiembre – 8 de octubre del 2004
Santa Clara. Villa Clara. CUBA.

El Instituto de Biotecnología de Las Plantas (IBP), está adscrito a la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Central de Las Villas, Cuba. Fue fundado en 1992 y sus objetivos básicos están dirigidos especialmente al desarrollo eficiente de las investigaciones, por lo cual se le concede vital importancia al desarrollo y aplicación de técnicas biotecnológicas con vistas al mejoramiento genético de plantas y a la producción de semillas de alta calidad. Tiene además, como característica principal, una estrecha unión con la producción, para lo cual cuenta con una Biofábrica.

PROGRAMA CIENTÍFICO

Lunes 27 de Septiembre

Recibimiento y apertura oficial del curso.

Martes 28 de septiembre

9:00 AM - 12:30 PM

CONFERENCIA 1. Aspectos básicos de la embriogénesis somática. Iniciación y mantenimiento de los cultivos embriogénicos.

Dra. Marisol Freire Seijo

2:00 PM - 5:00 PM

CLASE PRÁCTICA 1. Selección del tipo de explante para la inducción de la embriogénesis somática.

Dr. Raúl Barbón Rodríguez

raul@ibp.edu.cu

Miércoles 29 de septiembre

9:00 AM - 12:30 PM

CONFERENCIA 2. Diferenciación, germinación y conversión de embriones somáticos.

Dr. Raúl Barbón Rodríguez

CLASE PRÁCTICA 2. Formación y multiplicación de callos para la inducción de embriones somáticos

Dra. Lourdes García Rodríguez

Jueves 30 de septiembre

9:00 AM - 12:30 PM

CLASE PRÁCTICA 3. Establecimiento y mantenimiento de suspensiones celulares.

Dra. Marisol Freire Seijo

2:00 PM - 5:00 PM

CLASE PRÁCTICA 4. Caracterización y estimación del crecimiento celular.

Dra. Marisol Freire Seijo

Viernes 1 de octubre

9:00 AM - 12:30 PM

CONFERENCIA 3. Bases moleculares y fisiológicas de la embriogénesis somática.

Dr. Raúl Barbón Rodríguez

2:00 PM - 5:00 PM

CLASE PRÁCTICA 5. Diferenciación y germinación de embriones somáticos en especies dicotiledóneas y monocotiledóneas.

MsC. Elisa Quiala

Sábado 2 y Domingo 3 de octubre

Actividades planificadas por la Agencia de Viajes *UniversiTur*.

Lunes 4 de octubre

9:00 AM - 12:30 PM

CONFERENCIA 4. Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales.

Dra. Yelenys Alvarado Capó

2:00 PM - 5:00 PM

CONFERENCIA 5. Variación somaclonal en plantas regeneradas *via* embriogénesis somática.

Dra. Lourdes García Rodríguez

Martes 5 de octubre

9:00 AM - 12:30 PM

Conferencia 6. Empleo de la embriogénesis somática en la propagación masiva de plantas.

Dr. Manuel de Faria Silva

2:00 PM - 5:00 PM

CLASE PRÁCTICA 6. Detección y observación microscópica de contaminantes microbianos del cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales.

Dra. Yelenys Alvarado Capó

Miércoles 6 de octubre

9:00 AM - 12:30 PM

CLASE PRÁCTICA 7. Aspectos básicos y principio de funcionamiento de los biorreactores (CMF 100, CHEMAP AG) para el cultivo de células vegetales. *Primera parte.*

Dr. Manuel de Faria Silva

CLASE PRÁCTICA 7. Aspectos básicos y principio de funcionamiento de los biorreactores (CMF 100, CHEMAP AG) para el cultivo de células vegetales. *Segunda parte.*

Dr. Manuel de Faria Silva

Jueves 7 de octubre

9:00 AM - 12:30 PM

CONFERENCIA 7. Empleo de la embriogénesis somática en el mejoramiento genético.

MsC. Idalmis Bermúdez Caraballoso

2:00 PM - 5:00 PM

CONFERENCIA 8. Conservación de germoplasma *in vitro*.

MsC. Leyanis García Águila

Viernes 8 de octubre

10:00 AM. CLAUSURA.

yelenys @ ibp. uclv. edu. cu. | Laboratorio de Fitología
yelenys 69 @ yahoo. com.

Clase Práctica No. 1

Dr. Raúl Barbón Rodríguez

SELECCIÓN DEL TIPO DE EXPLANTE PARA LA INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

INTRODUCCIÓN

La inducción de la embriogénesis somática activa rutas de control genético, similares a las que presenta la embriogénesis cigótica, lo cual se puede considerar como un fenómeno universal para todas las plantas; sin embargo, genotipos individuales dentro de una especie varían grandemente en su capacidad embriogénica (Parrot, 1991). Tales diferencias genotípicas en la capacidad embriogénica son el reflejo de diferencias en la activación de elementos importantes en la ruta embriogénica.

La respuesta embriogénica depende del genotipo, del estado fisiológico de la planta, el explante y de la edad de la planta donadora (Roca 1991 y Canhoto *et al.*, 1999).

Todos los tejidos tienen la capacidad de formar callos *in vitro*, sin embargo no todos son capaces de dar lugar a embriones somáticos. Por lo general, se han usado diversos explantes, como segmentos de tallos y hojas (Cramer y Bridgen, 1997), microsporas (Nitta *et al.*, 1997), embriones cigóticos (Parra y Amo-Marco, 1998), cotiledones de embriones cigóticos (Cahnoto *et al.*, 1999), hipocótilos y ápices caulinares, inflorescencias maduras, óvulos (Cabasson *et al.*, 1999), y protoplastos (Bang *et al.*, 1999) de los que se han obtenido, con éxito, callos embriogénicos en varias familias de plantas. No obstante se ha planteado que los tejidos embrionarios y tejidos muy jóvenes son los que poseen una respuesta embriogénica activa (Dunstan *et al.*, 1995).

OBJETIVOS

1. Emplear distintos tipos de explantes para la inducción de la embriogénesis somática de forma directa o indirecta.
2. Desarrollar habilidades en la manipulación de los explantes.

PROCEDIMIENTO

Inducción de callos embriogénicos a partir de semillas

Material vegetal

Fruto inmaduro de caoba.

- Cepillar el fruto con abundante agua jabonosa.
- Colocar el fruto en una solución de Hipoclorito de Sodio (3.0% p/v) durante 20 minutos.

- Enjuagar el fruto dentro de la cabina de flujo laminar con agua destilada estéril y fraccionar con un bisturí estéril para extraer las semillas inmaduras.
- Eliminar la capa que cubre la semilla y tomar la zona de los cotiledones inmaduros.
- Separar los cotiledones y eliminar los bordes dejándolos en forma cuadrada, de un tamaño aproximado de 0.5 cm.
- Colocar cada fracción en medio de cultivo para la formación de callos.

Inducción de callos embriogénicos a partir de inflorescencias inmaduras

Material vegetal

Fascículos nodales de la inflorescencia masculina de *Musa AAAB*, cv. FHIA-18.

- Tomar la inflorescencia masculina cuando hayan abierto diez brácteas después de la última flor femenina.
- Con la ayuda de un cuchillo, cortar 10 cm antes del ápice y eliminar las brácteas, hasta reducirlas hasta un tamaño aproximado de 3.0 cm.
- Desinfectar con alcohol al 70% (v/v) durante 15 minutos en la cabina de flujo laminar.
- Enjuagar las inflorescencias tres veces con agua destilada estéril, para eliminar los residuos de alcohol.
- Mantener el material vegetal sumergido en agua estéril para evitar su deshidratación.
- Extraer bajo el microscopio estereoscópico los 14 fascículos nodales más cercanos al meristemo floral (considerado este como cero).
- Colocar los fascículos desde el cinco hasta el doce, en frascos de cultivo con el medio de cultivo para la formación de los callos. Mantener el material vegetal en condiciones de oscuridad y temperatura de $27 \pm 2.0^\circ\text{C}$.

Inducción de callos embriogénicos a partir de hojas jóvenes

Material vegetal

Spindles de caña de azúcar (último entrenudo del tallo compuesto por un conjunto de hojas arrolladas que envuelven el meristemo vegetativo).

- Tomar spindles y eliminar las hojas maduras que envuelven el ápice.
- Desinfectar con Hipoclorito de Sodio (NaOCl) al 3.0% (v/v) durante 10 minutos.
- Eliminar en condiciones asépticas las hojas arrolladas hasta llegar a las hojas más jóvenes que envuelven el meristemo apical, denominadas hojas A y B según la clasificación realizada por Guiderdoni y Demarly (1988) para el cultivo de la caña de azúcar.
- Fraccionar en pequeños discos, con un diámetro de 3.0 – 5.0 mm.

- Tomar los primeros cinco discos desde la base del meristemo hacia arriba, sin incluir la región del meristemo.
- Colocar los discos en el medio de cultivo de formación de callos en condiciones de oscuridad y 28 ± 2 °C de temperatura.

REFERENCIAS

- Bang JW, Dong SI, Sung HC, Jang RL (1999) Plant regeneration from embryogenic cells-derived protoplast of *Bupleurum falcatum*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 55: 151-154
- Cabasson, C, Alvard D, Dambier D, Ollitrault P, Teisson C (1999) Improvement of citrus somatic embryo development by temporary immersion. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 50: 33-37
- Canhoto, JM, Lopes ML, Cruz GS (1999) Somatic embryogenesis and plant regeneration in myrtle (*Myrtaceae*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 57: 13-21
- Dunstan, DL, Tautorus TE, Thorpe TA (1995) Somatic embryogenesis in woody plants. En: Thorpe TA (ed) *In vitro embryogenesis in Plants*. pp. 471-538. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Guideroni, E, Demarly Y (1988) Histology of somatic embryogenesis in cultured leaf segments of sugarcane plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 14: 71 – 88.
- Nitta, T, Takahata Y, Kaizuma M (1997) Scanning electron microscopy of microspora embryogenesis in *Brassica* spp. *Plant Cell Report* 16: 406-410
- Parra, R, Amo-Marco JB (1998) Secondary somatic embryogenesis and plant regeneration in myrtle (*Myrtus communis* L.) *Plant Cell Report* 18: 135-144
- Parrot, W (1991) Auxin-stimulated somatic embryogenesis from immature cotyledons of white clover. *Plant Cell Report* 10: 17
- Roca, W (1991) Cultivo de tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. En: Roca, W y Mronginski LA (eds). CIAT. Cali.

Clase Práctica No. 2

Dra. Lourdes García Rodríguez

FORMACIÓN Y MULTIPLICACIÓN DE CALLOS PARA LA INDUCCIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS

INTRODUCCIÓN

La embriogénesis somática indirecta aparece cuando una fase de callo se interpone entre el explante original y la aparición de los embriones somáticos (Gómez, 1998).

Existen dos tipos de embriogénesis somática indirecta, una conocida como de alta frecuencia (ESAF) y otra de baja frecuencia (ESBF), con algunas diferencias entre ellas (Merkler *et al.*, 1995): En la ESBF los embriones aparecen entre las 12 y 14 semanas de cultivo, aislados o en pequeños grupos, pasando por los diferentes estadios de desarrollo. Mientras que en la ESAF los embriones aparecen entre las 16 y 20 semanas de cultivo, se mantienen en estado globular, agrupados en un número mayor, aunque estos grupos aparecen en menos callos.

En todas las etapas del cultivo de callos el genotipo juega un importante papel en el éxito del trabajo. Existen plantas más recalcitrantes que otras, por lo que la manipulación del material vegetal y la concentración de reguladores del crecimiento en el medio de cultivo difieren de una especie a otra, incluso entre variedades de una misma especie.

La etapa de formación de los callos es de forma general la menos importante, pues se logra con facilidad, sin embargo la multiplicación de los mismos y la inducción de los embriones somáticos son las más difíciles.

Los callos después de formados pueden multiplicarse con subcultivos que varían su número y duración (30-45 días) en dependencia de la especie de planta, separando estos en pequeñas fracciones con tamaño entre 2-5 mm. Generalmente se emplea el mismo medio de cultivo de formación para la multiplicación.

La evaluación del crecimiento de los callos se puede realizar a través de escalas que permiten definir de forma visual cómo se desarrolla la proliferación de los mismos sobre la superficie del explante. Además, existen otras formas de evaluar el crecimiento de los callos entre las que están: la determinación de la masa fresca y la masa seca de los mismos.

Desde el punto de vista morfogénico la característica más importante del callo es la totipotencia de sus células ya que en general con un manejo adecuado de las condiciones nutricionales, ambientales y de la concentración de los reguladores del crecimiento, tienen la capacidad de desarrollar embriones somáticos (Gómez, 1998).

El callo puede tener diferente apariencia y color en dependencia de la especie o genotipo con que se trabaje, así como las condiciones del cultivo *in vitro*. El color varía de blanco, blanco

amarillento a pardo. Su apariencia puede ser acuosa o compacta, seca y nodular. Los callos adecuados para la inducción de la embriogénesis somática de color amarillo a blanco y seco.

Los embriones somáticos pueden obtenerse a partir de los callos en un medio de cultivo sólido o transfiriendo fragmentos de estos o embriones somáticos en etapas tempranas a medios de cultivo líquidos para establecer suspensiones celulares.

OBJETIVOS

1. Identificar las características típicas de los callos para realizar los subcultivos y para la inducción de la embriogénesis.
2. Desarrollar habilidades en la multiplicación de callos de papa (*Solanum tuberosum* L.) y cafeto (*Coffea canephora*).
3. Evaluar el crecimiento de los callos.

PROCEDIMIENTO

Material vegetal

Callos de papa (*Solanum tuberosum* L.) y cafeto (*Coffea canephora*) obtenidos según las metodologías propuestas por Santana (1993)

Caracterización, multiplicación y determinación cuantitativa del crecimiento de callos de papa.

- Tomar callos formados en el borde de las hojas de plantas *in vitro* de papa. Eliminar los restos de hojas y sembrar los fragmentos de callos. Determinar el peso fresco de los callos sobre placas de Petri estériles, antes de colocarlos en el medio de cultivo.
- Determinar el peso fresco de callos de 25 días de cultivo para conocer el incremento de peso de los mismos según la fórmula $y = \text{masa fresca final} - \text{masa fresca inicial}$. Calcular además la tasa de crecimiento relativa:

$$TCR = \frac{2(P_2 - P_1)}{(P_1 + P_2)(t_2 - t_1)}$$

Donde:

TCR - Tasa de crecimiento relativo.

P₂ - peso fresco final.

P₁ - peso fresco inicial.

t₂ - t₁ - Tiempo de la evaluación (Intervalo de tiempo durante el incremento de la masa fresca).

Mediante la tasa de crecimiento relativa se expresa el incremento de la masa fresca por unidad de masa del tejido inicial y por unidad de tiempo (Vázquez y Torres, 1995).

- Subcultivar los callos y colocarlos en el medio de cultivo de inducción de embriones somáticos compuesto por las sales MS suplementadas con 1 mg.L⁻¹ de tiamina, 1mg.L⁻¹ de AIA, 0.2 mg.L⁻¹ de 2,4-D y 3% de sacarosa.

Caracterización y evaluación de callos de Cafeto.

- Evaluar según la escala propuesta por Santana (1982) callos de 12 semanas de cultivo.

Escala para evaluar el crecimiento de los callos.

<u>Grados</u>	<u>Descripción del crecimiento.</u>
1	Callo muerto
2	Callo vivo pero sin crecimiento
3	Callo con pequeños puntos de crecimiento
4	Callo creciendo en el 50% de su área
5	Callo con crecimiento del 100% de su área.

- Tomar explantes (de 12 semanas de cultivo) colocados en el medio de cultivo de formación de callos compuesto por las sales MS suplementadas con 0.8mg.L⁻¹ de tiamina, 3 mg.L⁻¹ de kinetina, 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D, 100mg.L⁻¹ de cystelna, 100mg.L⁻¹ de myoinositol y 2% de sacarosa. Eliminar los restos de hojas y callos de apariencia acuosa.
- Colocar los fragmentos de callos seleccionados en el medio de cultivo para la inducción de embriones. Incubar los frascos en la oscuridad a una temperatura de 27 ± 2°C.

REFERENCIAS

- Gómez, RK, (1998) Cultivo de Células y Tejidos. En: Pérez N. (Ed) Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. pp.25-44. Instituto de Biotecnología de Las Plantas. Santa Clara
- Merkler, SA, Parrot WA y Flinn BS (1995) Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. En: TA Thorpe (ed). *In vitro* Embryogenesis in Plants. Academic Press. New York
- Santana, N (1982) Determinación de un medio para la obtención de callos en variedades de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido) *in vitro*. Cultivos Tropicales. 24: 567-577
- Santana, N (1993) Embriogénesis somática en el cultivo del cafeto (*Coffea* spp.) Tesis de doctorado. INCA. Cuba. P. 230.
- Vázquez, E y Torres S (1995) Crecimiento y Desarrollo. En: Vázquez E y Torres S (Eds) Fisiología Vegetal. pp. 269-314. Editorial Pueblo y Educación.

Clase práctica No. 3

Dra. Marisol Freire Seijo

ESTABLECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DE SUSPENSIONES CELULARES EMBRIOGÉNICAS

INTRODUCCIÓN

El establecimiento de un cultivo de células en suspensión puede lograrse directamente a partir de inóculos tales como: mesófilo de hojas o fragmentos de cotiledones, transfiriendo porciones de callos al medio de cultivo líquido o embriones inmaduros. El primero de ellos tiene la desventaja de que las suspensiones celulares no pueden ser mantenidas en cultivo por largos períodos de tiempo, lo que hace necesario prepararlas frescas para cada experimento.

El establecimiento de un cultivo de células en suspensión a partir de fragmentos de callos depende de la calidad del tejido calloso. La utilización de callos como material vegetal inicial para el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas ha impedido la exitosa explotación de la embriogénesis somática en todas las especies vegetales. Una de las alternativas para solucionar este problema es utilizar directamente el medio de cultivo líquido *per se* desde la etapa inicial de formación de callos y la adición de cantidades de auxina o mezclas de ellas, lo que ha hecho posible el desarrollo de masas proembriogénicas y la multiplicación de éstas. El tejido utilizado puede ser seleccionado a partir de hojas, tallos, secciones de hipocotilo, pétalos, meristemas apicales, ovarios y embriones cigóticos, tubérculos y filamentos de anteras.

El cultivo en suspensión se establece después de un tiempo de adaptación de los callos y células en el medio de cultivo líquido. A esta etapa se le denomina también etapa de desagregación, en ella los callos, debido a la acción del movimiento del medio de cultivo líquido, liberan células. Al dividirse estas células el cultivo queda compuesto por células aisladas, agregados celulares de diversos tamaños, fragmentos residuales del inóculo y reminiscencias de células muertas, lo que conforma así la suspensión celular (Carman, 1990). El tiempo de desagregación, generalmente, se extiende de 15 a 35 días en dependencia del cultivo y la cantidad de inóculo inicial. Luego de este período, es necesario eliminar los residuos de callos y grandes agregados celulares ya que comienzan a aparecer células no embriogénicas que entorpecen el desarrollo de la suspensión celular. (Evans *et al.*, 1981).

Según Gómez (1998) el medio de cultivo más empleado para el crecimiento y desarrollo de las células en suspensión es el propuesto por Murashige y Skoog (1962) el cual se utiliza en distintos cultivos, como por ejemplo: caña de azúcar, café, bananos, plátanos, papa, etc.

Las condiciones óptimas para el máximo crecimiento y dispersión de las células varían de una especie a otra, pero la velocidad de agitación apropiada para la mayoría de los cultivos es de 60-

150 rpm. La velocidad óptima de agitación depende del cultivo en particular, del tipo de frasco y del volumen de medio de cultivo que debe guardar relación con el tamaño y forma del frasco de cultivo. Generalmente se usan 15-20 ml de medio de cultivo en Erlenmeyer de 100 ml o 30-50 ml para Erlenmeyer de 250 ml (Merkle *et al.*, 1995).

El período de tiempo entre la iniciación del cultivo y la fase estacionaria está determinado primeramente por:

- Densidad celular inicial.
- Duración de la fase de latencia.
- Incremento proporcional de la línea de células.

La mínima o crítica densidad inicial de células para lograr el crecimiento de una nueva suspensión celular depende de:

- El genotipo que se cultiva.
- De la duración e incubación del inóculo que se utiliza.
- Composición del medio de cultivo.

OBJETIVOS

1. Establecer suspensiones celulares a partir de callos embriogénicos.
2. Definir los aspectos a tener en cuenta para el mantenimiento de las suspensiones celulares embriogénicas.

PROCEDIMIENTO

Material vegetal

Se utilizarán para el establecimiento de las suspensiones celulares callos embriogénicos de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido)

Establecimiento de suspensiones celulares

- Seleccionar con el empleo del microscopio estereoscópico callos con estructuras embriogénicas.
- Colocarlos en Erlenmeyers con capacidad para 25 ml, con 2.0 ml de medio de cultivo. Estos frascos deben de chequearse y en caso necesario se adicionará medio de cultivo hasta llegar a 5.0 ml de volumen total.
- Las suspensiones celulares deben ser colocadas en Erlenmeyers de 100 ml y posteriormente de 250 ml. Para ello debe de transferirse el contenido de los Erlenmeyers a tubos de ensayos cónicos de 15 ml y medir el volumen que ocupan las células después de

la decantación de estas durante 2 min. La concentración final de células debe de ajustarse a 3.0% de VCS (Schoofs, 1997).

Es importante en esta fase muestrear periódicamente las suspensiones celulares para comprobar su calidad, vitalidad y posible contaminación microbiana.

Mantenimiento de suspensiones celulares embriogénicas

Material vegetal

Se utilizarán suspensiones celulares de bananos (*Musa spp.*).

- Las suspensiones celulares serán subcultivadas en Erlenmeyers de 250 ml, siempre a una concentración final de células del 3.0% de VCS.
- Determinar la concentración final de células por el método del volumen de células sedimentadas (VCS).
 - Transferir el contenido de los Erlenmeyers a tubos de ensayos cónicos de 10 ml, para medir el volumen que ocupan las células después de la decantación de estas a los dos minutos.
 - Posteriormente las células serán transferidas a un Erlenmeyer de 250 ml donde se adicionará medio de cultivo y seguidamente serán colocadas en el agitador orbital a 90 rpm.

REFERENCIAS

- Carman C (1990) Embryogenic cells in plant tissue cultures: occurrence and behavior. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 26: 746
- Evans D, Sharp W y Flick C (1981) Growth and behavior of cell cultures: embryogenesis and organogenesis. En: Thorpe T (ed) *Plant Tissue Culture: methods and applications in agriculture* pp. 45-113. Academic Press. New York
- Gómez R (1998) Embriogénesis somática. En: Pérez J (ed). *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. pp. 57-79. IBP. Santa Clara
- Merkle S, Parrott W y Flinn B (1995) Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. En: Thorpe T (ed). *In vitro Embryogenesis in Plant*. pp. 155-203. Academic Press. New York
- Murashige T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497
- Schoofs H (1997) The origin of embryogenic cells in *Musa*. *Dissertationes de Agricultura* p.258. Catholic University of Leuven, Leuven

Clase práctica No. 4

Dra. Maïsol Freire Seijo

CARACTERIZACIÓN Y ESTIMACIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR.

INTRODUCCIÓN

Los cultivos de células en suspensión generalmente son heterogéneos, con células aisladas y pequeños agregados celulares. La proporción entre ambos, así como su tamaño, depende de la especie vegetal de la cual se ha derivado el cultivo, de la edad del tejido en cultivo, de la composición del medio de cultivo y de las condiciones ambientales. En la mayoría de los cultivos, el 60% de las células pueden estar aisladas o formar grupos de dos células.

En las suspensiones celulares se pueden encontrar tres tipos de células:

- **Células meristemáticas:** Son las células pequeñas con núcleo central o laterizado con nucleolo, pared de mediano grosor y en ocasiones gruesa, con lámina media atravesada por plasmodesmos. El citoplasma es compacto, con escasas y pequeñas vacuolas con tonoplastos o sin estos, abundantes mitocondrias y los proplastidios son frecuentes. Los retículos endoplasmático liso y rugoso son ocasionalmente largos y paralelos a la membrana citoplasmática.
- **Células parenquimáticas:** Son células de mayor talla con el núcleo y el citoplasma desplazado hacia la periferia por la expansión de la vacuola. El núcleo contiene uno o dos nucleolos. Las mitocondrias y proplastidios están presentes en el citoplasma con iguales características que en las células meristemáticas.
- **Células gigantes:** Son células en las que la vacuola ocupa el estadio intracelular y ha comprimido hacia la pared al núcleo y al citoplasma con todos sus organelos. A tales efectos se aprecian paredes celulares delgadas con un halo de citoplasma que en ocasiones no es visible, la zona que ocupa la vacuola es un espacio ópticamente vacío.

Las suspensiones celulares pueden contener células embriogénicas y no embriogénicas. Las suspensiones embriogénicas tienen células embriogénicas que usualmente forman cluster o grupos de pequeñas células meristemáticas, referidas como masas embriogénicas. Las suspensiones celulares embriogénicas son morfológicamente diferentes a las suspensiones organogénicas. En estas últimas las células se encuentran aisladas o en pequeños grupos de dos a tres células, mientras que en las suspensiones celulares embriogénicas es característico observar agrupaciones o agregados compactos de células meristemáticas pequeñas.

Una vez establecida la suspensión celular es indispensable determinar cuál es el momento en el que las células han agotado los componentes del medio de cultivo, o al menos algunos de ellos, debido a su crecimiento y metabolismo y se necesita medio de cultivo fresco para continuar sus procesos fisiológicos normales. A esto se le denomina subcultivo (Shigeta *et al.*, 1996). El momento de subcultivo se determina a través de la curva de crecimiento de suspensión celular, donde la célula se comporta como un microorganismo y vive independientemente del tejido que le dio origen (Gómez, 1998).

Las fases de la curva de crecimiento celular son las siguientes:

- Fase de reposo.
- Fase exponencial.
- Fase lineal.
- Fase de disminución progresiva.

El período de tiempo entre la iniciación del cultivo y la fase estacionaria está determinado primeramente por:

- Densidad celular inicial.
- Duración de la fase de latencia.
- Incremento proporcional de la línea de células.

Según Schoof *et al.* (1999) la frecuencia de los subcultivos puede afectar el grado de agregación de las células. Frecuentes transferencias de medio de cultivo ocasionan una activación celular, lo cual puede resultar en un incremento de la formación de agregados celulares. Por ejemplo, el mayor número de agregados en zanahoria, plátanos y bananos se presenta tempranamente durante la fase de crecimiento exponencial y las células están más dispersas en la fase estacionaria (Gómez, 1998). El incremento de la formación de agregados durante el período de máxima división celular se debió al alto índice de mitosis en los agregados celulares y la menor división de las células aisladas.

El patrón de crecimiento de una suspensión celular depende de la densidad celular por mililitro de medio de cultivo a inocular. Con una densidad de inóculo baja, el crecimiento es muy lento o no ocurre. Por otra parte, si la densidad es muy alta la fase estacionaria se reduce, pero con esto el porcentaje de crecimiento cesa tempranamente, comenzando a morir rápidamente muchas células (Falco *et al.*, 1996). La exacta relación entre densidad de inóculo y patrón de crecimiento varía entre las distintas especies.

Para la confección de la curva de crecimiento celular los métodos más empleados son los conteos celulares, la determinación de la masa fresca y seca y la determinación del volumen de células sedimentadas (VCS) (Schoof, 1997).

OBJETIVOS

1. Caracterizar morfológicamente una suspensión celular embriogénica.
2. Estimar el crecimiento celular por los métodos de conteo celular, masa fresca, masa seca y volumen de células sedimentadas (VCS).

PROCEDIMIENTO

Material vegetal

Suspensiones celulares de banano (*Musa spp.*)

Caracterización

- Homogeneizar por agitación la suspensión celular.
- Tomar 1ml de suspensión celular.
- Añadir 20 μL de diacetato de fluorescencia (FDA) (Widholm, 1972) por cada mililitro de muestra.
- Esperar aproximadamente cinco minutos.
- Preparar la muestra en cámara de conteo celular Fuch-Rosental 0.2 mm de profundidad, auxiliándose de un microscopio óptico marca Axioskop (Firma Zeiss) con excitación a 450-490 nm y fluorescencia 510-520 nm.
- Durante la observación al microscopio deben ser identificadas células meristemáticas, vacuolazas o parenquimatosas, gigantes y agregados embriogénicos.
- Empleando un campo oscuro se determinará la vitalidad celular, esta se expresará en porcentaje (%) de células vivas respecto al total de células contadas.
- Para calcular el número de células/mL de suspensión celular se empleará la siguiente ecuación matemática:

$$\text{Número de células. mL}^{-1} = \frac{\text{Número de células contadas}}{\text{Número de cuadrículas contadas}} \times \text{FC} \times \text{FD}$$

Donde: FC= Factor de la cámara (5×10^3)

FD= Factor de dilución.

Estimación del crecimiento celular.

Para la determinar el crecimiento celular empleando el método de volumen de células sedimentadas se procederá como se describe seguidamente:

- Tomar todo el contenido del Erlenmeyer y colocarlo en tubos cónicos graduados.
- Esperar de 2 - 3 minutos para que todas las células decanten.
- Observar cuantos mililitros del tubo cónico son ocupados por las células sedimentadas.

- Resuspender las células en el medio de cultivo, colectarlas y colocarlas nuevamente en el Erlenmeyer.

Para determinar el crecimiento de la biomasa expresado en gramos de masa fresca por litro de medio de cultivo (gMF.L^{-1}) se procederá de la siguiente forma:

- Homogeneizar por agitación la suspensión celular.
- Tomar 50 mL de suspensión.
- Descargar la suspensión celular en discos de papel de filtro para eliminar el exceso de humedad, en caso necesario centrifugar y eliminar los restos de medio de cultivo.
- Exponer por espacio de 30 minutos a las corrientes de aire de una cabina de flujo laminar.
- Pesar las muestras y tomar el dato cuando este peso sea estable.

Para determinar la masa seca expresado en gramos de masa seca por litro de medio de cultivo (gMS.L^{-1}) se procederá de la siguiente forma:

- Colocar las muestras empleadas para determinar la masa fresca en una estufa durante cinco horas a $60 \pm 2.0^\circ\text{C}$, momento a partir del cual los valores de masa seca se deben mantener constantes, aunque esto depende de la especie vegetal con que estemos trabajando y el volumen de biomasa.
- Pesar las muestras.

En ambos casos, se utilizará para el pesaje una misma balanza analítica (Sartorius).

REFERENCIAS

- Falco, M.; Januzzi, B. y Tulmann, A. 1996. Cell suspension culture of sugarcane: growth, management and plant regeneration. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 8 (1).pp.1-6.
- Gómez, R. 1998. Capítulo 4. Embriogénesis somática. *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología.* (ed) Pérez, J. pp.57-79.
- Schoof, H. 1997. The origin of embryogenic cells in *Musa*. *Dissertationes de Agricultura.* Catholic University of Leuven, Belgium. p.258.
- Schoof, H.; Panis, B.; Strosse, H.; Mayo, A.; López, J.; Roux, N.; Dolezel, J. y Swennen, R. 1999. Cuellos de botella en la regeneración y mantenimiento de las suspensiones celulares morfogénicas de bananos y la regeneración de las plantas vía embriogénesis somática a partir de ellos. *INFOMUSA.* 8.No.2.pp.3-7.
- Shigeta, J.; Sato, K. y Mii, M. 1996. Effects of initial cell density, pH and dissolved oxygen on bioreactor production of carrot somatic embryos. *Plant Science.* Vol. 115.pp. 109-114.
- Widholm, J (1972) The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of culture plant cells. *Stain Technology* (47): 189-194

Clase Práctica No. 5

MSc. Elisa Quijala Mendoza

DIFERENCIACIÓN Y GERMINACIÓN DE LOS EMBRIONES SOMÁTICOS EN PLANTAS DICOTILEDÓNEAS.

INTRODUCCIÓN

La diferenciación y germinación de los embriones somáticos son etapas muy importantes de la embriogénesis somática. Estas son determinantes para conocer la calidad del evento morfogénico que se ha desarrollado. En ellas no solo se evalúa cuantitativamente la formación de los embriones somáticos, sino que se comprueba la calidad de los mismos en la medida en que estos sean capaces de germinar (Komamine, 1998).

Los embriones somáticos son estructuras bipolares con ejes apical y radical bien definidos y no poseen conexión vascular con el tejido materno. Estos mantienen similitud con los embriones cigóticos, con la diferencia de que no transcurren por un proceso de latencia, con una precoz germinación (Williams y Mashewaran, 1986; De Jong *et al.*, 1993). Los embriones somáticos de las especies dicotiledóneas transitan por cuatro estados de desarrollo embrionario: globular, corazón, torpedo y cotiledonar.

Durante el proceso de la embriogénesis somática se han observado detalles morfológicos que han revelado la existencia de cuatro fases de desarrollo: fase 0, fase 1, fase 2 y fase 3. En la fase final (fase 3) las especies dicotiledóneas continúan el desarrollo del embrión en los estados de corazón y torpedo (Komamine, 1998).

OBJETIVOS

1. Evaluar el proceso de formación de embriones somáticos en callos embriogénicos.
2. Clasificar los embriones somáticos según su etapas de desarrollo
3. Evaluar la germinación de los embriones somáticos.

PROCEDIMIENTO

Material vegetal

Embriones somáticos de caoba (*Swietenia mahagoni*) obtenidos a partir de embriones cigóticos inmaduros.

Obtención de embriones somáticos en medio de cultivo semisólido, en una especie dicotiledónea

Tomar callos con embriones somáticos, para evaluar con ayuda del microscopio estereoscópico los siguientes aspectos:

- El número total de embriones por callo.
- El número de embriones en etapa globular, corazón, torpedo y cotiledonar.
- El número de embriones anormales o deformados.

Evaluación de la germinación de embriones somáticos

Tomar embriones somáticos en fase de germinación para evaluar:

- Porcentaje de embriones germinados.
- Porcentaje de embriones somáticos con germinación parcial (emisión de brotes raíces).
- Porcentaje de embriones somáticos con malformaciones.
- Porcentaje de embriones somáticos con hiperhidricidad.
- Porcentaje de embriones somáticos con embriogénesis secundaria asociada.

REFERENCIAS

De Jong, AJ, Heidstra R, Spaink HP, Hartog MV, Meijer EA, Lo Schiavo F, Terzi M, Bisseling Van Kammen, A y de Vries SC (1993) *Rhizobium* oligosacaridos rescue a carrot som embryo mutant. Plant Cell 5: 615-620

Komamine, A (1998) Expresión génica en la embriogénesis somática. En: Libro de resúmenes III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal, REDBIO '98. La Habana (1-5 Junio)

Quiala E, Barbón R, Jiménez E, de Feria M, Capote A, Pérez N, Chávez M (2000) Establecimiento y multiplicación de suspensiones celulares de *Cymbopogon citratus* (L.) Staff. Revista Biotecnología Vegetal 2 (3): 155-161

Williams, EG y Mashewaran, G (1986) Somatic embryogenesis. Factors influencing Coordination Behavior of cell as an Embryogeni Group Ann. Bot. 57: 443-462

Clase Práctica No. 6

Dra. Yelenys Alvarado Capó

DETECCIÓN Y OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE CONTAMINANTES MICROBIANOS DEL CULTIVO *IN VITRO* DE CÉLULAS Y TEJIDOS VEGETALES

INTRODUCCIÓN

La presencia de microorganismos en el cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales, de forma general, ha sido considerada indeseable a partir de que este se ha definido como aséptico. Tal problemática constituye uno de los principales obstáculos para el uso de métodos biotecnológicos con fines científicos o comerciales. En el establecimiento *in vitro* del material vegetal, en dependencia del tipo de explante utilizado, estos microorganismos pueden introducirse (Leifert y Cassells, 2001). Se mencionan como contaminantes tanto a patógenos de las plantas que se cultivan *in vitro* como a saprofitos.

La contaminación por bacterias se ha descrito como un "halo" generalmente en la superficie y bordeando la base de los explantes (Cassells y Tahmatsidou, 1996). Algunas especies son capaces de permanecer en el interior de las células, en los espacios intercelulares o en los haces conductores y así quedan protegidas de los agentes químicos. De esta forma se introducen en el cultivo *in vitro*, se propagan con el material vegetal y pueden manifestar crecimiento sobre los medios de cultivo o permanecer latentes por largos períodos de tiempo (ausencia de síntomas visibles sobre el material vegetal o de crecimiento microbiano sobre el medio de cultivo) (Cassells, 1991; George, 1993).

La presencia de levaduras en muchas ocasiones se confunde con las bacterias por su similitud en caracteres culturales (Leifert *et al.*, 1994). Por su parte, las características del crecimiento fungoso no difieren de las observadas en medios de cultivo micológicos. Estos microorganismos raramente permanecen latentes *in vitro* ya que el medio para el cultivo de células y tejidos proporciona todos los nutrientes esenciales que requieren para su crecimiento (Danby *et al.*, 1994; Leifert *et al.*, 1994).

De acuerdo con el criterio de Reed y Tanprasert (1995), para obtener cultivos asépticos se requiere prestar atención a los siguientes aspectos: muestreo de los explantes para detectar contaminantes y su cultivo, identificación de la fuente que los han introducido, identificación o caracterización de los mismos y su eliminación a partir de mejorar las prácticas en el laboratorio, uso de antibióticos u otros agentes químicos.

Entre los métodos de detección más utilizados se encuentran: rozar la superficie cortada del explante sobre un medio de cultivo bacteriológico durante los subcultivos (De Fossard y De

Fossard, 1988) y la transferencia de fragmentos de material vegetal a medios de bacteriológicos (Knauss, 1976; Leifert *et al.*, 1994; Reed *et al.*, 1995; Borrás *et al.*, 1996, referido también la modificación de los medios de cultivo de las plantas con la adición de componentes de medios para el cultivo de bacterias (Boxus y Terzi, 1988), Agua destilada (Norman y Alvarez, 1994) y variando el pH (Tanprasert y Reed, 1998). Además, se ha utilizado por algunos autores métodos turbidimétricos (Meyner y Arnould, 1989).

OBJETIVOS

- 1- Observar caracteres culturales del crecimiento de bacterias, levaduras y hongos filamentosos en medios para el cultivo de plantas *in vitro*, callos y suspensiones celulares.
- 2- Diferenciar bacterias, levaduras y hongos filamentosos por sus caracteres morfológicos en observaciones al microscopio óptico.
- 3- Detectar bacterias contaminantes en suspensiones celulares por observación al microscopio óptico.
- 4- Detectar contaminantes bacterianos en plantas *in vitro* y callos por siembras de fragmentos de tejido vegetal en medios de cultivo bacteriológicos.

PROCEDIMIENTO

Observación de caracteres culturales del crecimiento de bacterias, levaduras y hongos filamentosos en medios para el cultivo de plantas *in vitro*, callos y suspensiones celulares

- Observar a simple vista y en el microscopio estereoscópico, cultivos de plantas, callos y suspensiones celulares contaminados.
- Observar la ubicación de los contaminantes en el medio de cultivo con respecto al material vegetal.
- Describir los principales caracteres culturales de cada grupo microbiano (color, consistencia, tipo de crecimiento).

Observación de preparaciones directas, fijas y teñidas de microorganismos contaminantes

- Realizar preparaciones directas de microorganismos contaminantes (*bacterias*: en agua destilada estéril, *levaduras*: en lactofenol).
- Observar al microscopio óptico con los aumentos de 400 y 1000x.
- Describir los principales caracteres morfológicos de cada grupo microbiano (*bacterias*: forma, agrupación, motilidad, presencia de endospora; *levaduras*: forma, agrupación).

presencia y tipo de gemación; *hongos filamentosos*: pigmentación, presencia de septos, presencia y tipo de estructuras de reproducción).

- Realizar tinciones simples de bacterias contaminantes (colorante safranina) y se observarán al microscopio óptico con los aumentos de 400 y 1000x (forma, agrupación, presencia de endospora).

Detección de bacterias contaminantes en suspensiones celulares por observación al microscopio óptico

- Tomar alicuotas de suspensiones celulares y se observarán al microscopio óptico con los aumentos de 400 y 1000x.

Detección de contaminantes bacterianos en plantas *in vitro* y callos por siembra de fragmentos de tejido vegetal en medios de cultivo bacteriológicos

- Cortar en condiciones asépticas fragmentos de plantas *in vitro* y callos.
- Colocar en placas de Petri con medio de cultivo Agar Triptona Soya (ATS).
- Incubar a temperatura de 30°C durante 24-72h.
- Observar la presencia de crecimiento bacteriano alrededor o sobre los fragmentos de material vegetal.
- Rozar, en forma de estrías, la base de explantes cortados durante un subcultivo de multiplicación, sobre la superficie de medio de cultivo ATS contenido en placas de Petri.
- Incubar a 30°C durante 24-72h.
- Observar la presencia de crecimiento bacteriano sobre las estrías.

REFERENCIAS

Borrás, O, González R, Concepción O, Cid M, Nápoles L, Recio MI, Escalante D, Escalona M, Trujillo R y Borroto C (1996) Metodología para el control de las contaminaciones en el cultivo *in vitro* de plantas ornamentales. Cuadernos de Fitopatología 4:138-142

Boxus, PH y Terzi JM (1988) Control of accidental contamination during mass propagation. Acta Horticulturae 225:189- 193

Cassells, AC (1991) Problem in tissue culture: culture contamination. En: Debergh P y Zimmerman RH (Eds), Micropropagation, pp. 31-45. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Cassells, AC y Tahmatsidou V (1996) The influence of local plant growth conditions on non-fastidious bacterial contamination of meristem-tips of *Hydrangea* cultured *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 47:15-26

Danby, S, Berger F, Howiilt D, Wilson A, Dawson S y Leifert C (1994) Fungal contaminants of *Primula*, *Coffea*, *Musa* and *Iris* tissue cultures. En: Lumsden, P J, Nicholas, J R , Davies, W J,

(eds.) Physiology, growth and development of plants in culture. Kluwer Academic Publishers. pp. 397-403. Dordrecht.

De Fossard, RA y De Fossard, H (1988) Coping with microbial contaminants and other matter in small commercial micropropagation laboratory. *Acta Hort.* 225: 167- 176

George, EF (1993) Plant propagation by tissue culture. Chapter 5, Part1. 2nd Ed., pp. 130-143. Exegetics Ltd.

Knauss, JF (1976) A tissue culture method for producing *Dieffenbachia picta* cv " Prefection " free of fungi and bacterial. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 89: 293- 296

Leifert, C, Morris CE y Waites WM (1994) Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plants: reason for contamination problems *in vitro*. *Critical Reviews in Plant Sciences* 13: 139- 183

Meyner, V y Arnould MF(1989) Compared effectiveness of antibiotic treatments and shoot tip culture on bacterial decontamination of an *in vitro* propagated clone of hybrid Walnut (*Juglands nigra* x *J. regia*). *Biologia Plantarum* 31(4): 269-275

Norman, DJ y Alvarez, AM (1994) Latent infections of *in vitro* *Anthurium* caused by *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 39: 55- 61

Reed, B, Buckley PM y DeWilde TN (1995) Detection and eradication of endophytic bacteria from micropropagated mint plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 31: 53-57

Reed, BM y Tanprasert P (1995) Detection and control of bacteria contaminants of plant tissue cultures. A review of recent literature. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 1(3): 137-142

Tanprasert, P y Reed BM (1998) Detection and identification of bacterial contaminants from strawberry runner explants. *Plant Cell, Tissue and organ Culture* 52:53-55

Clase Práctica No. 7

Dr. Manuel de Faria Silva

Aspectos básicos y principio de funcionamiento de los biorreactores (CMF 100, CHEMAP AG) para el cultivo de células vegetales

INTRODUCCIÓN

El cultivo a gran escala de células de plantas comenzó hace aproximadamente 44 años, cuando fue descrito el crecimiento de suspensiones celulares en un biorreactor de 20 litros. A partir de ese momento, se aplicaron las técnicas de fermentación microbiana en estudios sobre el crecimiento cinético de las suspensiones celulares de plantas superiores (Tulecke y Nickell, 1959).

A pesar de todo el desarrollo tecnológico, no fue hasta mediados de la década de los 80 (del siglo XX) que se profundizó más en el empleo de biorreactores para la producción de embriones somáticos.

Por ejemplo, en alfalfa Stuart *et al.* (1987) describieron la obtención de grandes producciones de embriones somáticos, pero éstos presentaron un rango de conversión muy bajo. Por su parte,apat *et al.* (1990) hicieron referencia a la producción de 18 000 ES.L⁻¹ en el cultivo de *Santalum album* L. (sándalo), empleando para ello biorreactores de 1.0 y 7.0 litros de capacidad.

En otras especies, como es el caso de *Clematis* se han logrado rendimientos de hasta 500 000 S.L⁻¹ con el empleo de biorreactores de 2.0 litros capacidad, con más de un 95.0% de conversión (Veber *et al.*, 1994). Sin embargo, en otros cultivos como por ejemplo en *Ipomoea batata* L. (boniato) los resultados no han sido satisfactorios y la formación de embriones somáticos y su posterior desarrollo se ha limitado, probablemente debido a una desfavorable composición de gases en la atmósfera interna del vaso de cultivo y/o a la sensibilidad de este cultivo al estrés mecánico (Bieniek *et al.*, 1995).

La tecnología de los biorreactores fue principalmente desarrollada para la producción de biomasa, por lo que los vasos para el cultivo de las diferentes especies vegetales han tenido que ser adaptados a los requerimientos específicos para el crecimiento de las suspensiones celulares (Preil, 1991). Por lo tanto, el diseño de un biorreactor y el uso de parámetros adecuados para el desarrollo de las especies vegetales, son elementos que deben ser determinados experimentalmente. De esta forma, en dependencia de las necesidades y los requerimientos, los biorreactores deben ser objeto de modificaciones en sus componentes para lograr diseños específicos, pues no existe un equipo universal para todas las aplicaciones (Preil, 1991).

Este criterio de trabajo ha permitido que después de la década de los 90 (Siglo XX) se propiciaran modificaciones y se avanzara mucho más en la producción de plantas en biorreactores, tanto por la organogénica (Akita y Ohta, 1996; Akita *et al.*, 1996; Takayama y Akita, 1996; Takayama y

Akita, 1998; Ziv *et al.*, 1998) como embriogénica (Zamarripa, 1996; Lipsky *et al.*, 1997; Nishihira *et al.*, 1998; Gómez *et al.*, 2002; de Feria *et al.*, 2003).

El objetivo básico de un biorreactor es proveer las condiciones de crecimiento óptimas para las células mediante una regulación precisa de los factores ambientales (Preil, 1991). Según este autor para dar respuesta a los propósitos de la propagación masiva de plantas, los biorreactores de pequeña capacidad son suficientemente grandes, debido al elevado número de propágulos que se puede producir en ellos en comparación con los cultivos incubados en agitación utilizando Erlenmeyers. Sin embargo, no existen biorreactores universales para todas las aplicaciones, por tal motivo esta tecnología que se diseñó en un principio para realizar fermentaciones microbianas tuvo que ser adaptada y modificada para el cultivo de células vegetales. No obstante, aún existen limitaciones relacionadas con la configuración, el ambiente interno del vaso y las estrategias para el control de los principales parámetros de cultivo y lo que sí es indudable es que los biorreactores son equipos que han sido diseñados y fabricados para lograr un exacto monitoreo y control computarizado de las condiciones de cultivo, que a la vez permiten definir los requerimientos para el desarrollo de las células y la regeneración de plantas de una forma más precisa que las técnicas *in vitro* convencionales.

OBJETIVOS

1. Conocer las principales partes componentes y accesorios de los biorreactores empleados para el cultivo de células vegetales, con particular énfasis en un biorreactor CMF 100 (CHEMAP AG) con vaso de cultivo de 2.0 L de capacidad.
2. Profundizar en el principio de funcionamiento por separado de las diferentes partes del biorreactor, así como en el funcionamiento integral del equipo.
3. Adquirir habilidades en la calibración de los electrodos de oxígeno y pH, así como en el montaje y la puesta a punto de un biorreactor para su esterilización.
4. Estandarizar los diferentes parámetros de cultivo en un equipo ya esterilizado, con particular énfasis en la calibración del 100% de oxígeno disuelto.
5. Inocular un vaso de cultivo y puesta nuevamente en funcionamiento del equipo y estabilización de los parámetros de cultivo.

PROCEDIMIENTO

PRIMERA PARTE

Se mostrarán las partes componentes de un biorreactor CMF 100 (CHEMAP AG) con vaso de cultivo de 2.0 L de capacidad, así como se describirá la función de cada una.

Se ensamblarán y se adquirirán habilidades en la calibración del electrodo de pH y en la puesta a punto del biorreactor para su esterilización, incluyendo la misma.

SEGUNDA PARTE

Calibración del electrodo de oxígeno (100%) (con el equipo ya esterilizado) e inoculación de un vaso de cultivo con una suspensión celular de FHIA-18.

Principales partes componentes de un biorreactor CMF 100 (CHEMAP AG) destinado para el cultivo de células

- Unidad de control.
- Unidad base.
- Unidad mezcladora de gases.
- Vaso de cultivo.

Principales accesorios.

- Bombas peristálticas.
- Electrodo de pH, oxígeno y dióxido de carbono.
- Sondas de temperatura.
- Sistemas de toma de muestra.

Protocolo para una corrida

Puesta a punto de un biorreactor para la esterilización.

- Montaje
- Calibración
- Esterilización

Puesta a punto de un biorreactor para su inoculación, cultivo y conservación

- Estandarización
- Inoculación
- Seguimiento de la corrida
- Parar la corrida
- Desmontaje y lavado

Montaje del biorreactor

Una vez lavado el equipo se procede a su montaje:

- Se coloca con mucho cuidado la parte superior del vaso y se asegura la misma.
- Se revisan las gomas de los puertos ciegos y si están dañados se sustituyen por otras nuevas.

- Se colocan las mangueras correspondientes al suministro de aire, en el biorreactor hay dos puertos de entrada de aire, dos corresponden al aire al fondo del tanque y uno corresponde a aire a la cabeza (HEADSPACE).
- La manguera de aire a la cabeza está unida a un filtro de aire por el extremo (estéril), es decir, el que va al biorreactor y por el extremo no estéril del filtro va unido otro pedazo de manguera a un rotámetro.
- Las mangueras de suministro de aire al fondo del equipo (la del sparger) se une a un filtro y de aquí sale para un rotámetro.
- La manguera de la toma de muestra va unida a una T que por un lado está conectada a otra que posee un filtro y por el otro a un aditamento para descargar la muestra tomada.

Calibración de los electrodos

Calibración del electrodo de pH

La calibración del electrodo de pH se realiza con las soluciones buffer de pH = 7.01 y pH = 4.01. Se enciende el CBC-10 y se activa el modo calibración, una vez inmerso el electrodo dentro de cada solución (alternadamente), se espera la estabilidad del valor medido y entonces es que se realiza la calibración activando el botón 1CAL ó 2CAL en dependencia de que buffer se esté utilizando en ese momento.

Este procedimiento se realiza como mínimo de cinco a seis veces y se anotan los valores de milivolts.

Calibración del electrodo de O₂

Esta operación se hace una vez esterilizado el biorreactor.

Si se deja enfriar, se le hace pasar N₂ durante varias horas hasta que se desplace todo el oxígeno, o cuando se saca de la autoclave bien caliente se calibra el 0% y para ello se oprime el botón 1CAL.

Se le hace pasar aire al biorreactor durante una o dos horas de modo que se elimine todo el N₂ que esté presente en el vaso de cultivo o se establezca la concentración de oxígeno y en este momento se realiza la calibración en 100% y para ello se oprime el botón 2CAL.

Esterilización del vaso de cultivo

Se coloca en la autoclave y se esteriliza durante 30 minutos a 121 Kg.cm⁻² y 1.0 atmósfera de presión.

Protocolo para el llenado de la chaqueta de enfriamiento del vaso

- Conectar las mangueras de entrada y de salida a la chaqueta del vaso. Verificar además que la manguera de drenaje esté conectada.

- Verificar que todos los interruptores estén apagados, solo el de POWER encendido.
- Chequear que las válvulas de WATER BATH y COOLING WATER estén cerradas (estas válvulas se encuentran a la derecha de la unidad base).
- Chequear que la válvula de la línea principal de suministro de agua y la válvula de agua del servicio de la unidad, estén abiertas.
- Abrir la válvula de WATER BATH completamente de 5 a 10 min.
- Encender la bomba de suministro de agua a la chaqueta de enfriamiento (el interruptor está en la parte posterior de la Unidad Base con el nombre de PUMP) y cuando el nivel de líquido suba en la chaqueta y esté recirculando, cerrar la válvula de WATER BATH y dejarla 1/4 abierta.

Operaciones para la toma de muestras

- Se cierra la presilla de la salida o entrada del sparger para que no pase medio de cultivo al filtro.
- Se aplica aire por la cabeza (hay que cerrar la salida de aire y aplicar aire a través del rotámetro para lograr que el medio de cultivo suba).
- Se limpian los residuos de medio de cultivo viejo con medio de cultivo fresco y se desechan.
- Luego se toma la muestra.
- Se cierran las presillas que van por la tubería de toma de muestra y se aplica aire para limpiar la tubería de la T hacia la cabina de flujo laminar, luego se cierra esta salida y se abre la que va al vaso muy suavemente hasta regresar todo el medio de cultivo y se verá un burbujeo ligero por el tubo de toma de muestra, luego se ponen las presillas y se retiran las puestas inicialmente.

Operaciones para la instalación del electrodo de oxígeno

- Eliminar el *protecting cap*, el mismo protege mecánicamente la membrana y al cuerpo de cristal sensible y ayuda a retrasar el desecado del electrolito.
- Eliminar el *covering sleeve* atornillado del eje del electrodo.
- Sacar el cuerpo de la membrana del cuerpo interior del electrodo.
- Llenar el cuerpo de la membrana completamente con electrolito de O₂ (incluido en el kit de mto 10301024). Eliminar todas las burbujas de aire mediante un golpe ligero contra la pared del cuerpo de la membrana.
- Mantener el electrodo con la estría o surco mostrando hacia la parte superior y deslizar el cuerpo de la membrana lenta y cuidadosamente para fuera del cuerpo interior para permitir que el electrolito excesivo fluya fuera del surco.

- Eliminar el exceso de electrolito con un papel absorbente. Estar seguro que no permanece electrolito entre el cuerpo de la membrana y el gasket O-ring trapezoidal de caucho.
- Chequear que no permanezcan burbujas de aire en la superficie del cátodo.
- Poner el *covering sleeve* cuidadosamente, unirlo al cuerpo de membrana ensamblado y atomillado.
- Montar el electrodo de O₂ dentro de la boquilla especial.
- Conectar el cable del electrodo a la unidad de control.
- Encender la unidad de control para polarizar el electrodo.
- El voltaje de operación entre el ánodo y el cátodo se activa por este paso. Al comienzo, la corriente del electrodo es muy grande, pero decae luego exponencialmente. Una polarización completa del electrodo se alcanza después de algunas horas. Como el tiempo de polarización es relativamente grande, el electrodo debe permanecer si es posible conectado al amplificador de operación aún si no está siendo usado, su vida de trabajo no se reducirá por esto. El tiempo de polarización requerido corresponde aproximadamente al tiempo de interrupción. Una interrupción de 15 seg no tiene influencia en la polarización.

REFERENCIAS

- Akita M y Ohta Y (1996) Development of a system for mass propagation of *Colocasia esculenta* in large scale without forced aeration. *Acta Horticulturae* 440: 554-559
- Akita M, Ohta Y y Tozai K (1996) Development of a system for mass propagation of *Colocasia esculenta* in large scale without forced aeration. *Acta Horticulturae* 440: 554-559
- Bapat VA, Fulzele DP, Heble MR y Rao PS (1990) Production of sandalwood somatic embryos in bioreactors. *Current Science* 59: 746-748
- Bieniek ME, Harrell RC y Cantliffe DJ (1995) Enhancement of somatic embryogenesis of *Ipomoea batatas* in solid cultures and production of mature somatic embryos in liquid cultures for application to bioreactor production system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 41: 1-8
- de Feña M, Jiménez E, Barbón R, Capote A, Chávez M y Quiala E (2003) Effect of dissolved oxygen concentration on differentiation of somatic embryos of *Coffea arabica* cv. Catimor 9722". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72: 1-6
- Gómez R, de Feña M, Posada L, Reyes M, Gilliard T, Chávez M y Quiala E (2002) Somatic embryogenesis of the banana hybrid cultivar FHIA-18 (AAAB) in liquid medium and scaled-up in a bioreactor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68: 21-26
- Jay V, Genestier S y Courduroux JC (1994) Bioreactor studies of the effect of medium pH on carrot (*Daucus carota* L.) somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36: 205-209.

Lipsky AK, Sahar N, Holland D, Flaishman MA, Perl A, Altman A y Ziv M (1997) Development and growth of embryogenic suspension cultures of *Vitis vinifera* cvs in bioreactor as a system for genetic transformation. *Acta-Horticulturae* 447: 313-316

Molle F, Dupuis JM, Ducos JP, Anselm A, Crolus-Savidan I, Petiard V y Freyssinet G (1993) Carrot somatic embryogenesis and its application to synthetic seeds. En: K. Redenbaugh (Ed.), *Synseeds. Applications of synthetic seeds to crop improvement*, 15: 257-287

Nishihira T, Hayashi Y y Matsumoto K (1998) Somatic embryo induction from cell suspension culture of *Aralia cordata* using bioreactors. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 67: (1) 87-92

Onishi N, Sakamoto Y y Hirose T (1994) Synthetic seeds as an application of mass production of somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 39: 137-145

Osuga K y Komamine A (1994) Synchronization of somatic embryogenesis from carrot cells at high frequency as a basis for the mass production of embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 39: 125-135

Preil W (1991) Application of bioreactors in plant propagation. En: P.C. Debergh y R.H. Zimmerman (Eds.), *Micropropagation*. pp. 425-445. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht

Stuart DA, Strickland SG y Walker KA (1987) Bioreactor production of alfalfa somatic embryos. *Hortscience* 22: 800-803

Takayama S y Akita M (1996) Biorreactor advances for the large-scale production of propagules. *Cost 822 Workshop on Somatic Embryogenesis, Artificial Seeds and Bioreactors*, p. 2.

Takayama S y Akita M (1998) Bioreactor techniques for large-scale culture of plant propagules. *Advances in Horticultural Science* 12: 93-100.

Tulecke W y Nickell LG (1959) Production of large amounts of plant tissue by submerged culture. *Science* 130: 863-864

Weber J, Preil W y Lieberei R (1994) Somatic embryogenesis in bioreactor culture of *Clematis tangutica*. VIII Int. Cong. of Plant Tissue and Cell Culture, Firenze. *Book of Abstracts* p. 202.

Zamarripa A (1996) La biotecnología aplicada en la producción de plantas de café a gran escala. XVII Simposio sobre Caficultura Latinoamericana, 1 p. 6.

Ziv M, Ronen G y Raviv M (1998) Proliferation of meristematic clusters in disposable presterilized plastic bioreactors for the large-scale micropropagation of plants. *In Vitro Cellular and Development Biology Plant* 34: 152-158