

Efecto de los principales parámetros físico-químicos sobre el proceso de embriogénesis somática a escala de biorreactores

Manuel de Feria Silva

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e-mail: mdeferia@ibp.uclv.edu.cu

RESUMEN

Los biorreactores han sido principalmente desarrollados para la producción de biomasa, por lo que los vasos para el cultivo de las diferentes especies vegetales con fines de propagación, han tenido que ser adaptados en función de los requerimientos específicos de cada proceso y cultivo. De esta forma, y debido a que no existe un equipo universal para todas las aplicaciones, los biorreactores han sido objeto de modificaciones en sus componentes en dependencia de los requerimientos de cada especie. Se ha comprobado, además, que la configuración interna del vaso de cultivo influye de manera decisiva sobre la producción y desarrollo posterior de los embriones somáticos. Por lo tanto, es necesario resolver las limitaciones tecnológicas y estudiar el efecto de los principales parámetros de cultivo para poder emplear este tipo de tecnología como una alternativa para la propagación masiva de plantas. Se han evaluado diferentes sistemas de agitación-aireación y se han probado diseños que generan bajas fuerzas hidrodinámicas en el interior del vaso de cultivo, que garantizan la calidad y viabilidad de los cultivos en suspensión, así como la formación y multiplicación de los embriones somáticos. Se han estudiado para varios cultivos los efectos que provocan los principales parámetros físico-químicos en la propagación vía embriogénesis somática a escala de biorreactores. Además, se han definido metodologías y estrategias de trabajo que combinan dichos parámetros de cultivo y permiten controlar y obtener de manera estable producciones de embriones somáticos capaces de germinar y convertir en plantas y estos resultados definitivamente permitirán llevar a escala comercial el empleo de esta tecnología para la propagación *in vitro* de muchas especies de interés económico.

Palabras clave: agitación, aireación, configuración interna, oxígeno disuelto, pH

ABSTRACT

The bioreactors has been mainly developed for the production of biomass, for that that the glasses for the culture of the different vegetable species with propagation ends, they have had to be adapted in function of the specific requirements of each process and cultivation. This way and because a universal team doesn't exist for all the applications, the bioreactors has been object of modifications in their components in dependence of the requirements of each species. He has also been proven that the internal configuration of the culture glass influences in a decisive way on the production and later development of the somatic embryos. Therefore, it is necessary to solve the current technological limitations and to study the effect of the main culture parameters to be able to use this technology type like an alternative for the mass propagation of plants. Different systems have been evaluated of agitation-aeration and designs have been proven that generate drops hydrodynamic forces inside the culture glass, guaranteeing the quality and viability of the culture in suspension, as well as the formation and multiplication of the somatic embryos. They have been studied for several cultures the effects that cause the main physical-chemical parameters in the propagation via somatic embryogenesis to bioreactors scale. They have been defined methodologies and work strategies that combine this culture parameters and they allow to control and to obtain in way stable productions of somatic embryos able to germinate and to transform into plants and these results definitively will allow to take to commercial scale the employment of this technology for the propagation *in vitro* of many species of economic interest.

Keywords: agitation, aeration, dissolved oxygen, internal configuration, pH

INTRODUCCIÓN

El cultivo a gran escala de células de plantas comenzó hace aproximadamente 45 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 que se profundizó más en el empleo de biorreactores para la producción de embriones somáticos.

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, Bapat *et al.* (1990) hicieron referencia a la producción de 18 000 ES.l⁻¹ en el cultivo

de *Santalum album* Linn. (Sándalo), con el empleo de biorreactores de 1.0 y 7.0 litros de capacidad.

En el género *Clematis* se han logrado rendimientos de hasta 500 000 ES.l⁻¹ con biorreactores de 2.0 litros capacidad y porcentajes de conversión del 95.0% (Weber *et al.*, 1994). Sin embargo, en otros cultivos, como por ejemplo boniato (*Ipomoea batatas* L.), 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).

Entre las plantas consideradas como modelos para desarrollar la embriogénesis somática hasta el escalado en biorreactores, la zanahoria (*Daucus carota* L.) ha jugado un papel fundamental, pues con anterioridad a 1995 ya se habían descrito varios sistemas para la producción de embriones somáticos (Molle *et al.*, 1993; Jay *et al.*, 1994; Osuga y Komamine, 1994; Onishi *et al.*, 1994).

Este criterio de trabajo ha permitido que en los últimos 10 años se propiciaran las condiciones y se avanzara mucho más en la producción de plantas en biorreactores, tanto por la vía organogénica (Akita *et al.*, 1996; Takayama y Akita, 1996; Takayama y Akita, 1998; Ziv *et al.*, 1998) como embriogénica (Zamarripa, 1996; Lipsky *et al.*, 1997; Jiménez y de Feria, 1998; Nishihira *et al.*, 1998; Gómez *et al.*, 1999; de Feria *et al.*, 2003).

Principales parámetros físico-químicos a monitorear y controlar en un biorreactor

El objetivo básico de un biorreactor es garantizar óptimas condiciones de crecimiento para las células mediante una regulación precisa de los factores ambientales (Preil, 1991).

Los biorreactores han sido equipados con varios sensores para la medición y el control de la temperatura, de la velocidad de agitación, la concentración de oxígeno disuelto (DO₂), el pH, el potencial redox y la concentración de dióxido de carbono (CO₂), etc. (Preil, 1991; Leathers *et al.*, 1995).

El principal inconveniente para el desarrollo de este tipo de tecnología radica en que no existe un diseño de biorreactor que se adapte a todas las aplicaciones y la mayoría de los existentes en el mercado han sido desarrollados para el cultivo de microorganismos. Por tanto, se hace necesario evaluar aspectos como la configuración interna del vaso de cultivo y diferentes parámetros físico-químicos que influyen de manera decisiva en la producción y desarrollo de los embriones somáticos.

Formas de agitación y efectos que provocan

Los biorreactores empleados para el cultivo de células pueden ser clasificados de dos formas atendiendo al sistema de agitación utilizado (Preil, 1991).

- Biorreactores agitados por flujo de aire.
- Biorreactores con movimiento mecánico.

En los biorreactores agitados por flujo de aire, la dispersión del gas comprimido en el fondo del vaso de cultivo, se realiza a través de platos o discos perforados u otros mecanismos para la distribución del gas, un ejemplo lo constituyen los cilindros coaxiales que establecen corrientes de aire en el interior del vaso y estabilizan los patrones de circulación del líquido y dan como resultado, un flujo bien definido (Denchev *et al.*, 1992). Estas corrientes de aire dividen el vaso en dos regiones, una gaseada y otra que sirve como lazo, ejemplo de ello es el diseño comúnmente conocido como "airlift", biorreactor con el cual se han obtenido resultados favorables en la producción de embriones somáticos (Nishihira *et al.*, 1998). Sin embargo, a pesar de todos estos elementos los vasos de cultivo agitados mecánicamente continúan siendo el principal interés para el cultivo de brotes y células de plantas.

En el caso del cultivo de células, hay que tener en cuenta su sensibilidad a las elevadas fuerzas hidrodinámicas, razón por la cual se deben emplear impulsores tipo anclas, paletas o hélices que permitan lograr un buen mezclado con bajos rangos de agitación (Leathers *et al.*, 1995), los que sólo pueden lograrse, si se determinan de forma experimental los efectos que pudieran producirse al variar el número de cuchillas, su posición interior y la relación entre el diámetro del agitador y el vaso.

El hecho de determinar el tipo de cuchilla impulsora es importante pues permite una mejor mezcla y por consiguiente una aireación más eficiente. Según Preil (1991), las cuchillas con un diámetro de 1/3 del diámetro del vaso de cultivo, permiten lograr una adecuada relación entre la cuchilla, la velocidad de agitación y el mezclado. No obstante, lo importante es saber que el tipo de cuchilla depende de las características del proceso que se va a ejecutar, pues en ocasiones ocurre que el sistema no garantiza la homogeneidad del cultivo en suspensión y se produce el asentamiento de la biomasa en el fondo del vaso de cultivo (Scragg, 1995).

Otro de los principales problemas para el cultivo de células en suspensión, es la formación de grupos, que afectan no sólo el cultivo al emplear agitadores orbitales, sino también en algunos tipos de biorreactores (Beck, 1987).

En dependencia del número de células por grupo, la morfología de los grupos y el número de grupos por

unidad de volumen de medio de cultivo, se puede afectar el mezclado, el muestreo del cultivo y se limita el empleo de algunos métodos para la estimación del número de células (Preil *et al.*, 1988).

La formación de grupos de células puede limitarse por la composición del medio de cultivo, el método de subcultivo o la alteración de las condiciones ambientales.

Según Beck (1987) el sistema de agitación denominado "Vibromixer" caracterizado por generar bajas fuerzas hidrodinámicas, puede controlar el tamaño y la formación de agregados celulares. El mismo consiste en un disco con conos cortados y huecos, que cuando son movidos en la dirección de la parte ancha, causan un chorro que será formado al final de la parte estrecha. Si este cono es movido arriba y abajo, se obtiene el efecto de una bomba de propulsión continua.

Este sistema de agitación está conformado por un eje y uno o dos discos montados sobre éste. Los discos son perforados con orificios circulares perfectos para formar en cada orificio los llamados conos de Bernoulli.

El flujo de propulsión es inducido en la dirección de la parte más estrecha y el sistema se agita por un movimiento vertical recíproco, que nunca rota y que presenta algunas ventajas sobre los sistemas giratorios, debido a que:

- No hay remolinos ya que no hay movimientos rotatorios.
- No hay espuma porque no hay remolinos.
- No hay sellos rotatorios, sólo movimiento recíproco.
- El sello estático consiste en un diafragma periférico y centralmente ajustado alrededor del agitador del disco del "Vibromixer" y puede resistir hasta una presión de 5.0 bares.
- No existen puntos de fricción, el sistema queda herméticamente sellado.

El efecto vibratorio inhibe la aglomeración de células y reduce el número de estas por agregado. En experimentos con suspensiones de flor de pascua (*Euphorbia pulcherrima* L.), el promedio de células por agregado decreció desde 18 a 6, al cabo de 18 días, cuando a un biorreactor con "Vibromixer" se inoculó con una suspensión celular que se encontraba en un agitador orbital (Preil, 1991).

Para el propósito de la propagación de plantas, el "Vibromixer" puede tener amplias ventajas sobre otros mezcladores rotatorios, fundamentalmente para aquellas especies de plantas que tienden a formar grupos multimeristemáticos compactos y que necesitan ser separados en pequeñas unidades, para lo cual deberá ser investigada la calibración de los diferentes diámetros de los orificios del disco (Preil y Beck, 1991).

A pesar de haberse demostrado que éste sistema de agitación resulta adecuado para la agitación moderada sin causar ningún daño celular, se comprobó que tiene la desventaja de que al incrementarse la viscosidad de la suspensión celular, la eficiencia de la agitación decrece y se sabe que este fenómeno ocurre en la especie flor de pascua (*Euphorbia pulcherrima* L.) cuando la densidad celular es aproximadamente de 6.0×10^5 células.ml⁻¹ (Preil, 1991).

Los efectos de la agitación deben ser determinados para lograr condiciones óptimas, especialmente en cultivos con células sensibles al movimiento y en cualquier biorreactor deberán ser evitados los daños por agitación (causado por altas velocidades de agitación) y la limitación de oxígeno (favorecida por las bajas velocidades de agitación), debido a que ambos factores son determinantes en el rendimiento final de biomasa y la producción total de embriones somáticos (Jiménez y de Feria, 1998).

Medición y control de la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo

La concentración de oxígeno disuelto (DO₂) en el medio de cultivo, ha sido descrita como uno de los parámetros más importantes y de mayor influencia, no sólo sobre la multiplicación y diferenciación de suspensiones celulares, sino también en la formación de brotes. Hasta el presente, se han estudiado y analizado diferentes efectos y comportamientos que se producen al variar las concentraciones de disponibilidad de este gas en el medio de cultivo.

Kessell y Carr (1972) demostraron al trabajar con suspensiones celulares de zanahoria (*Daucus carota* L.) que existe una concentración crítica de DO₂, por debajo de la cual se limita la multiplicación celular y se favorece la diferenciación de los embriones somáticos en plantas.

En suspensiones celulares de flor de pascua (*Euphorbia pulcherrima* L.) cultivadas en Enlermeyers agitados a 90 r.p.m., se determinó que después del primer día de realizado el subcultivo existía un valor de 70% de DO₂, que esta concentración decreció al 32% a los cuatro días y a un 14% después del octavo día de cultivo, debido fundamentalmente al incremento de la biomasa (Beck, 1987).

Durante estos estudios, Beck (1987) comparó además, el crecimiento de suspensiones celulares durante 18 días de cultivo continuo a concentraciones constantes de DO₂ (30 y 90%) y observó que el número de células por mililitros se incrementó desde 1.0×10^5 hasta 2.5 y 7.3×10^5 , respectivamente. Según Preil *et al.* (1988) la multiplicación de esta especie en biorreactores fue inhibida drásticamente al emplear concentraciones por debajo del 10% de DO₂.

En cuanto a la producción de embriones, Kessel y Carr (1972) sólo lograron regenerar embriones somáticos de zanahoria cuando utilizaron 16% de DO₂, mientras que Carman (1988) logró incrementar el número de embriones de *Triticum vulgare* Willd. (Trigo) al utilizar también bajas concentraciones de DO₂. Sin embargo, Stuart *et al.* (1987) produjeron 102 000 ES.l⁻¹ de alfalfa con un 78% de DO₂ y no obtuvieron embriones somáticos con 21%, mientras que Jay *et al.* (1992) al utilizar una concentración de 100% obtuvieron un rendimiento de 600 000 ES.l⁻¹ de zanahoria (*Daucus carota* L.) y sólo lograron 170 000 al trabajar con una concentración del 10%.

Okamoto *et al.* (1996), observaron que en arroz (*Oryza sativa* L.) con 60% de DO₂ se logró una regeneración de plantas más eficiente que con concentraciones superiores (80 y 100%) o inferiores (21 y 40%). Por su parte, Mavituna y Buyukalaca (1996), al trabajar la embriogénesis somática en pimiento (*Capsicum annuum* cv. Ace), describieron como el consumo de oxígeno fue mayor en las etapas iniciales de multiplicación con respecto al momento de la maduración de los embriones somáticos. Estos resultados evidenciaron que existe una estrecha relación entre la disponibilidad de oxígeno disuelto en el medio de cultivo y el grado de desarrollo de los embriones somáticos en suspensión.

de Feria *et al.* (2003), demostraron que las elevadas concentraciones de oxígeno disuelto (80%) favorecieron la producción total de embriones somáticos de *Coffea arabica* cv. Catimor 9722 (café), pero limitaron el desarrollo posterior de estos embriones somáticos hasta la etapa de torpedo, que son en realidad los embriones con mayores posibilidades de germinar y convertirse en plantas. Este resultado se alcanzó al trabajar con concentraciones inferiores (50%). Las investigaciones realizadas permitieron obtener hasta 73 000 embriones somáticos por litro de medio de cultivo.

Según Archambault *et al.* (1995), al utilizar concentraciones de DO₂ iguales o superiores al 60%, se producen altos volúmenes de biomasa no diferenciada y que por el contrario, con bajas concentraciones (10-20%) ocurre una lenta diferenciación de los grupos celulares embriogénicos en suspensiones de zanahoria (*Daucus carota* L.). Estos autores plantearon que las bajas concentraciones de DO₂, produjeron una limitación en la formación de biomasa no diferenciada (< 5.0%) y una mayor producción y más normal de embriones somáticos con una disminución de la germinación precoz.

Al emplear elevadas concentraciones de oxígeno disuelto (80%) se logró, en el cultivo de la caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido), reducir el tiempo de multiplicación de las suspensiones celulares y aumentar la biomasa fresca respecto al proceso

desarrollado a escala de agitador orbital (de Feria, 2002). Sin embargo, se observó un efecto negativo de estas condiciones sobre el proceso de desarrollo de los embriones somáticos. Este autor estableció una estrategia en dos etapas para el control del oxígeno disuelto y se obtuvo por primera vez a escala mundial con esta tecnología, la producción de 32 000 embriones somáticos por litro de medio de cultivo y demostró, además, que el pH puede ser utilizado como un indicador del proceso de histodiferenciación de suspensiones celulares embriogénicas de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido).

La determinación de la concentración de DO₂ en el medio de cultivo líquido, indica la cantidad disponible para el metabolismo celular. Este gas es poco soluble en agua y su contenido es rápidamente consumido por las células, por lo tanto debe ser suministrado continuamente para prevenir su decrecimiento por debajo de la concentración crítica, pues se ha demostrado que para muchos cultivos en suspensión, el oxígeno influye de manera determinante sobre la actividad metabólica de las células (Preil, 1991).

Estudios realizados con banano (FHIA-18) permitieron definir una estrategia de trabajo que combinó diferentes concentraciones de oxígeno disuelto con el control del pH, con lo cual se obtuvo un 31% de embriones somáticos maduros y se alcanzaron producciones de hasta 140 000 embriones somáticos por litro de medio de cultivo en sólo 18 días de trabajo con los biorreactores, resultado sin precedentes a escala mundial (de Feria, 2002).

La cantidad de DO₂ disponible es medida por electrodos que deben ser calibrados después de la esterilización y antes de la inoculación del biorreactor.

El nivel de DO₂ puede ser controlado de varias formas, pero la más común es al regular la velocidad de agitación y el flujo de aire (Kessell y Carr, 1972), pues cuando sólo se hace énfasis en uno de estos dos elementos se obtiene una menor precisión, que si se trabajara combinando ambos factores (Preil, 1991).

Una de las variantes utilizadas para el suministro de gases, han sido las unidades mezcladoras de aire, N₂, O₂ y CO₂, que permiten realizar un mejor y más eficiente trabajo para mantener la concentración de DO₂ durante el cultivo de células vegetales (Beck, 1987; Preil, 1991; Jay *et al.*, 1992).

La mezcla de gases puede llegar de varias formas al interior del vaso de cultivo. Según Leathers *et al.* (1995) los sistemas basados en la aireación directa en el medio de cultivo (burbujeo) mediante "sparger" de acero inoxidable con una porosidad de 10 mm son los más frecuentemente empleados para el cultivo de células de plantas. Sin embargo, tienen como limitante el daño que causan a las células por la energía liberada durante el rompimiento de las

burbujas y la pérdida de las propias células por el arrastre que se produce al formarse espuma en la superficie del vaso (Teng *et al.*, 1993).

La aireación libre de burbujas mediante tubos de silicona o polipropileno es la que mejor simula el ambiente dentro de un Erlenmeyer y evita los problemas antes mencionados. Las especificaciones del tubo (longitud, diámetro, grosor de la pared) deben ser adaptadas de acuerdo con los requerimientos de cada especie vegetal, en función de la cantidad de biomasa y/o embriones somáticos que se produzcan en el biorreactor (Luttman *et al.*, 1994; Moorhouse *et al.*, 1996).

Todos estos resultados permiten concluir que fundamentalmente el tipo de biorreactor empleado, su volumen de trabajo, la composición del medio de cultivo, el flujo de aire, el procedimiento que se emplee para calibrar los electrodos de oxígeno, así como la forma en que se controla la concentración de DO_2 , son parámetros importantes que influyen en los rangos de transferencia de oxígeno y hacen que un experimento difiera de otro. Esta es una buena razón para esperar resultados contradictorios y profundizar en el estudio de este parámetro y su influencia sobre el comportamiento de los cultivos en suspensión en función de la fase en que éstos se encuentren dentro del proceso de histodiferenciación. No obstante, esta conclusión no anula la idea de que la concentración óptima de DO_2 , para cada proceso en particular, varía entre las diferentes especies vegetales.

Medición y control del pH en el medio de cultivo

Los primeros estudios sobre las variaciones del pH en suspensiones celulares se desarrollaron desde hace algunos años (Martin y Rose, 1976; Wetherell y Dougall, 1976). Según los resultados obtenidos por estos autores, estas variaciones, parecen estar relacionadas con el balance entre los iones de amonio (NH_4^+) y el nitrato (NO_3^-) en el medio de cultivo durante el ciclo de desarrollo celular.

Martin y Rose (1976), demostraron que en suspensiones celulares de boniato, el consumo de amonio fue menor a pH 4.8 que a un valor de 5.6. Un comportamiento similar en el consumo de este ion fue descrito por Jay *et al.* (1994), para la diferenciación de embriones somáticos en zanahoria (*Daucus carota* L.), al observar que a pH bajo (4.3) el consumo del amonio fue menor y las células sólo utilizaron hasta los 20 días de cultivo el 42% del total inicial, mientras que a un pH más elevado (5.8) las células consumieron el 78% en igual período de tiempo.

La medición del pH parece ser indispensable para cualquier cultivo en suspensión celular y el mismo varía cuando se producen alteraciones en el ambiente interno del frasco y las condiciones de cultivo.

Los electrodos para realizar las lecturas de pH son esterilizables y el control de este parámetro a escala de biorreactores se realiza cuando la señal del controlador activa una bomba peristáltica, la cual adiciona ácido o base en dependencia de la desviación con respecto al valor fijado previamente, llegando a ser la precisión del control de 0.01 unidades de pH (CHEMAP AG, 1991).

También se ha demostrado en numerosos experimentos que el desarrollo y la maduración de los embriones somáticos puede favorecerse mediante la regulación del pH en el medio de cultivo y que en este caso el valor puede diferir claramente del pH en un cultivo no controlado.

Es significativo, que pese a lo planteado por Fujimura y Komamine (1979), con respecto a que la regulación del pH podía ser una vía alternativa en el cultivo de la zanahoria (*Daucus carota* L.) para la sincronización de las suspensiones celulares sin la utilización de procesos de filtración y centrifugación, hayan tenido que pasar varios años para que se produjeran resultados en tal sentido.

Smith y Krikorian (1990), al trabajar la diferenciación de células de zanahoria, pero en un medio de cultivo semisólido libre de reguladores del crecimiento, obtuvieron que con un pH cercano a 4.0 se mantuvo la proliferación y multiplicación de proembriones y sólo cuando el pH fue ajustado a un valor de 5.8, se desarrollaron los restantes estados de la embriogénesis somática para este cultivo.

Investigaciones realizadas por de Fera *et al.* (2003) permitieron observar una estrecha relación entre el momento de aparición de los embriones somáticos y el incremento gradual de los valores de pH en el medio de cultivo, lo cual convirtió a este parámetro en un posible indicador del proceso de histodiferenciación de las suspensiones celulares embriogénicas de café.

También con el cultivo de la zanahoria Jay *et al.* (1994), observaron que a pH 4.3 los embriones somáticos no se desarrollaron más allá del estado de corazón, mientras que, a valores de 5.8 los embriones somáticos maduraron y dieron lugar a plantas más desarrolladas con grandes raíces y cotiledones verdes individualizados. Shigeta *et al.* (1996), confirmaron, además, que en suspensiones celulares embriogénicas de este cultivo, la presencia de embriones somáticos y su estado de desarrollo durante el cultivo en suspensión, se relacionó con determinados valores de pH en el medio de cultivo. Ellos observaron como en cuatro tratamientos con valores diferentes de pH inicial, los rangos finales oscilaron entre 5.1 y 5.2, lo que corroboró algunos criterios sobre la relación que existe entre el pH y la presencia de embriones

somáticos en sus distintos estados de desarrollo durante un cultivo en suspensión.

Por su parte, Jiménez y de Feria (1998), observaron durante el proceso de embriogénesis somática en caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido) cómo este parámetro decreció durante los primeros 13 días de cultivo desde 5.5 hasta 4.71 y se mantuvo oscilando alrededor de ese valor durante cuatro días, momento en el cual comenzó a incrementarse gradualmente y coincidió también con la aparición de los embriones somáticos en el medio de cultivo, hasta alcanzar un valor de 5.2 al finalizar este (25 días).

También se ha encontrado que los cambios de pH en el medio de cultivo pueden afectar la calidad celular de los cultivos. Autores como Rajkai *et al.* (1995) estudiaron el desarrollo de suspensiones celulares de *Rubia tinctorum* L. en agitador orbital y biorreactores y encontraron daños celulares asociados con los cambios del pH, pues comprobaron que al renovar el medio de cultivo este se incrementaba hasta 5.8 para descender nuevamente a 4.4 y estabilizar de esa manera las condiciones de cultivo. Por tal motivo sugirieron como una posible variante para disminuir los daños celulares, ajustar el pH del medio de cultivo destinado para la renovación, al valor en que éste se encontraba al momento de ser renovado.

Según todos estos resultados, la medición y el manejo del pH podrían ser un parámetro a tener en cuenta cuando se trabaje de forma masiva con suspensiones celulares para obtener un número considerable y eficiente de embriones somáticos bien desarrollados, no sólo de zanahoria sino también en otras especies. Por otra parte, este manejo podría convertirse en una herramienta que podría ayudar en la optimización y la sincronización de la embriogénesis somática, teniendo en cuenta las dificultades que se presentan actualmente para lograr sincronizar el desarrollo de los embriones somáticos por otras vías (Jay *et al.*, 1994).

CONCLUSIONES

Diseñar y poner en práctica sistemas de agitación-aireación con los cuales se logren generar bajas fuerzas hidrodinámicas y se evite la formación de espuma en el interior del vaso de cultivo, garantizarán la calidad y viabilidad de los cultivos en suspensión, así como la formación y multiplicación de los embriones somáticos. Si unido a esto se estudian y controlan los efectos que sobre la propagación vía embriogénesis somática tienen diferentes parámetros físico-químicos, se podrá entonces, definir metodologías y estrategias de trabajo a escala de biorreactores que combinen dichos parámetros de cultivo y posibiliten monitorear, controlar y obtener de manera estable producciones de embriones somáticos capaces de germinar y convertirse en plantas.

REFERENCIAS

- 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
- Archambault J, Lavoie L, Williams RD y Chavarie C (1995) Nutritional aspects of *Daucus carota* somatic embryo cultures performed in bioreactors. En: M Terzi (Ed.), *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*, pp. 681-687. Kluwer Academic Publisher. Dordrech
- Bapat VA, Fulzele DP, Heble MR y Rao PS (1990) Production of sandalwood somatic embryos in bioreactors. *Current Science* 59: 746-748
- Beck A (1987) Untersuchungen zur somatischen embryogenese unter verschiedenen bioreaktor-bedingungen, insbesondere bei *Euphorbia pulcherrima*. Diplomarbeit, p. 103
- 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
- CHEMAPAG (1991) Complete manual for the CMF 100 laboratory fermenter. pp. 40-66. Berlin
- de Feria M (2002) Biorreactores: Una Tecnología Alternativa. *Ciencia, Innovación y Desarrollo* 7 (3): 27-30
- de Feria M, Jiménez E, Barbón R, Capote A, Chavéz 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
- Denchev PD, Kuklin AI y Scragg AH (1992) Somatic embryo production in bioreactors. *Journal of Biotechnology*, 26: 99-109
- Fujimura T y Komamine A (1979) Synchronization of somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Plant Physiology* 64: 162-164
- Gómez R, de Feria M, Posada L, Gilliard T, Bernal F, Reyes M, 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
- Gómez R, de Feria M, Posada L, Reyes M, Gilliard T, Chávez M y Quiala E (1999) Somatic embryogenesis in liquid media and scale up in Bioreactor of the hybrid cultivar FHIA-18 (AAAB). En: Libro de Reportes Cortos "5^o Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal. pp. 106-109. IBP. Santa Clara
- Jay V, Genestier S y Courduroux JC (1992) Bioreactor studies on the effect of dissolved oxygen concentrations on growth and differentiation of carrot (*Daucus carota* L.) cell cultures. *Plant Cell Reports* 11: 605-608
- 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
- Jiménez E y de Feria M (1998) Empleo de Biorreactores para la propagación masiva. En: JN Pérez (Eds.) *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*, pp. 207-224. IBP. Santa Clara
- Kessel RHJ y Carr AH (1972) The effect of dissolved oxygen concentration on growth and differentiation of carrot (*Daucus carota*) tissue. *Journal of Experimental Botany* 23 (77): 996-1007
- Leathers RR, Smith ML y Aitken-Christie J (1995) Automation of the bioreactor process for mass propagation and secondary

- metabolism. En: J Aitken-Christie, T Kozai and ML Smith. (Eds.) Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture, pp. 187-214
- 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
- Luttman R, Florek P y Preil W (1994) Silicone-tubing aerated bioreactors for somatic embryo production. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 39: 157-170
- Martin SM y Rose D (1976) Growth of plant cell (*Ipomoea*) suspension cultures at controlled pH levels. Can Journal Botany 54: 1264-1270
- Mavituna F y Buyukalaca S (1996) Somatic embryogenesis of pepper in bioreactors: a study of bioreactor type and oxygen-uptake rates. Applied Microbiology and Biotechnology 46 (4): 327-333
- 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: pp. 257-287
- Moorhouse SD, Wilson G, Hennerty MJ, Selby C y Mac A (1996) A plant cell bioreactor with medium-perfusion for control of somatic embryogenesis in liquid cell suspensions. Plant-Growth-Regulation 20 (1): 53-56
- 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
- Okamoto A, Kishine S, Hirose T y Nakazono A (1996) Effect of oxygen-enriched aeration on regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) cell culture. Plant Cell Reports 15: 731-736
- 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: PC Debergh y RH Zimmerman (Eds.) Micropropagation, pp. 425-445
- Preil W y Beck A (1991) Somatic embryogenesis in bioreactor culture. Plant Breeding, 179-192
- Preil W, Florek P, Wix U y Beck A (1988) Towards mass propagation by use of bioreactors. Acta Horticulture 226: 99-106
- Rajkai G, Hollosy F, Laszlo M y Kovacs G (1995) Dynamics of pH changes in *Rubia tinctorum* cell suspension. Horticultural Science 27: 3-4
- Scragg AH (1995) The problems associated with high biomass levels in plant cell suspensions. Plant-Cell, Tissue and Organ Culture 43 (2): 163-170
- 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 115: 109-114
- Smith DL y Krikorian AD (1990) Somatic embryogenesis of carrot in hormone-free medium: external pH control over morphogenesis. American Journal Botany 77: 1634-1647
- Stuart DA, Strickland SG y Walker KA (1987) Bioreactor production of alfalfa somatic embryos. Horticulture 22: 800-803
- Takayama S y Akita M (1996) Bioreactor advances for the large-scale production of propagules. Cost 822 Workshops 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
- Teng WL, Lin CP y Liu AJ (1993) Regenerating lettuce from suspension culture in a 2-liter bioreactor. Horticulture 28: 669-671
- 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
- Wetherell DF y Dougall DK (1976) Sources of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissue. Physiology Plant 37: 97-103
- 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