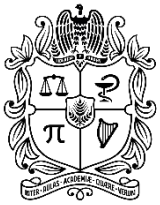


UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Variación en las condiciones de cultivo para mejorar la producción de biomasa en cultivos de células en suspensión de *Solanum tuberosum (subsp.* andígena) a escala de matraz agitado por lotes

Jorge Mario Muñoz Pérez

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Medellín, Colombia

2018

Variación en las condiciones de cultivo para mejorar la producción de biomasa en cultivos de células en suspensión de *Solanum tuberosum (subsp.* andígena) a escala de matraz agitado por lotes

Jorge Mario Muñoz Pérez

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias - Biotecnología

Director (a):

Ph .D Rafael Arango Isaza

Codirector (a):

Ph .D Mario Arias Zabala

Línea de Investigación:

Cultivo de células vegetales en suspensión para producción de proteínas recombinantes

Grupo de Investigación:

Biotecnología vegetal UNALMED-CIB y Biotecnología industrial

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Medellín, Colombia

2018

A mis padres Gloria Cecilia y Pedro Nel

Y a todos los que me ayudaron, especialmente a Isabel Ortega

Resumen

Las suspensiones de células vegetales son ampliamente usadas para la producción de metabolitos secundarios y proteínas recombinantes (Larrick *et al*. 2001; Shaaltiel *et al*. 2012; Tekoah *et al*. 2015; Huang et al 2002; Wirth et al 2004; Xu, J., y Zhang, N. 2014; Bentebibel *et al.* 2005; Aslam et al 2010; DiCosmo y Misawa, 1996), uno de aspectos más importantes en el establecimiento de estos cultivos en suspensión consiste en la evaluación de las condiciones de cultivo como: La temperatura, el tiempo de cultivo, la velocidad de agitación y la composición del medio de cultivo con el objetivo de incrementar los rendimientos (Rasche *et al.* 2016)

Con el objetivo de aprovechar a *Solanum tuberosum* como plataforma de producción de proteínas recombinantes en 2016 se establecieron suspensiones celulares de la variedad pastusa suprema con éxito limitado en la inducción de suspensiones debido problemas de fenolización (Granger 2016). Con este mismo propósito el objetivo de esta investigación fue evaluar condiciones de cultivo favorables para el establecimientoy crecimiento de cultivos de células en suspensión de *S. tuberosum* a escala de matraz agitado.

Los entrenudos tratados con 2,4 - D a 2mg. L^{-1} mostraron los mejores porcentajes de formación de callo (89%). Mediante un diseño factorial con tres factores y tres niveles para el medio de cultivo y el tipo de tapón y dos niveles para la velocidad de agitación. Se encontró que las condiciones de cultivo que más favorecen el crecimiento de las suspensiones celulares son: medio MS, velocidad de agitación 110 rpm y tapón de aluminio. Alcanzando una concentración máxima de biomasa de 15.67g L^{-1} (Peso seco), velocidad máxima específica de crecimiento de 0.178 h^{-1} y tiempo de duplicación de 3.89 días.

Palabras clave: Cultivos en suspensión de células vegetales, cultivo *in vitro*, molecular farming, *Solanum tuberosum L.*

Abstract

Plant cell suspension cultures have been widely used for the production of secondary metabolites and recombinant proteins (Larrick *et al*. 2001; Shaaltiel *et al*. 2012; Tekoah *et al*. 2015; Huang et al 2002; Wirth et al 2004; Xu, J., y Zhang, N. 2014; Bentebibel *et al.* 2005; Aslam et al 2010; DiCosmo y Misawa, 1996) one of the most important aspects in the plant cell suspension cultures consist in the evaluation of the growth conditions like: temperature, culture time, agitation velocity and the composition of the culture media in order to increase the yields.

With the aim to take advantage of *Solanum tuberosum* as a production platform of recombinant proteins in 2016 suspension cell cultures were established of the variety *pastusa suprema* with limited success in the suspension induction process due to high phenolization levels (Granger 2016). with the same aim, the objective this research was to find favorable culture conditions for the establishment of suspension cell cultures of *S. tuberosum* in flask scale.

The inter nodes treated with 2mg. L^{-1} of 2,4 - D shown the best percentages of callus induction (89%) Through factorial design with three factors and three levels for type of culture media and stopper and 2 levels for agitation velocity. The most favored growth conditions were found to be: growth medium MS, agitation speed 110 rpm and aluminum stopper. Reaching a maximum biomass concentration of 15.67g L^{-1} (dry weight), a maximum specific growth rate of 0.178 h^{-1} and a doubling time of 3.89 days were found.

Keywords: plant cell suspension, *in vitro* culture, *Solanum tuberosu*

Contenido

1. Introducción 14
2 Estado del arte 17
2.1 Influencia de la composición del medio de cultivo en el crecimiento en las suspensiones celulares vegetales 17
2.2 Influencia de la velocidad de agitación en el crecimiento de las suspensiones celulares vegetales. 19
2.3 Influencia del tipo de tapón en el crecimiento de las suspensiones celulares vegetales 20
3 Objetivos 22
4 Metodología 23
4.1 Material biológico 23
4.1.1 Plantas in vitro 23
4.1.2 Inducción de callos friables 24
4.1.3 Establecimiento de suspensiones celulares 30
4.1.4 Efecto del tipo de tapón, composición del medio de cultivo y velocidad de agitación en el crecimiento de biomasa en las suspensiones celulares. 31
4.2 Métodos análiticos 33
4.2.1 Peso seco. 33
4.2.2 Pruebas de contaminación para hongos y bacterias 33
4.3 Ecuaciones 34
4.3.1 Índice de crecimiento (IC) 34
4.3.2 Velocidad específica de crecimiento μ_{max} 34
4.3.3 Tiempo de duplicación t_d 34
4.4 Análisis estadístico 35
4.4.1 Índice de crecimiento (IC) 35
5 Resultados y discusión 36
5.1 Establecimiento de callos 36
5.2 Efecto del tipo de medio en el crecimiento celular 38
5.3 Efecto del tipo de tapón en el crecimiento celular 42
5.4 Efecto de la velocidad de agitación sobre el crecimiento celular 40
5.5 Pardeamiento celular 40
5.6 Cinética de crecimiento 42
6 Conclusiones y recomendaciones 45
7 Anexos 46
7.1 Análisis estadístico 46
8 Bibliografía 48

Lista de figuras

Figura 1. Inducción de callos de *S. tuberosum* a partir de entre nudos en 2mg L^{-1} de 2,4-D…..... 36

Figura 2. Cultivos en suspensión de *S. tuberosum* en 2mg. L^{-1}de 2,4-D… 38

Figura 3. Índices de crecimiento reportados para las diferentes combinaciones para el tipo de tapón, composición del medio y velocidad de agitación (rpm). 42

Figura 4. Cultivos fenolizados con tapón de algodón. A: Cultivos en medio MS con tapón de algodón, B Cultivos en medio SH, C: Cultivos en medio B5… 44

Figura 5. Cultivos fenolizados con tapón de algodón. A: Cultivos en medio MS con tapón de algodón, B Cultivos en medio SH, C: Cultivos en medio B5… 46

Figura 6. Cultivos en medio SH que cambiaron de color y dejaron de crecer…..41

Figura 7. Cinética de crecimiento y dinámica del pH realizada a 110 rpm, con medio MS y con tapón de aluminio…..43

Lista de tablas

Tabla 1. Comparación entre diferentes sistemas vegetales de expresión… 15

Tabla 2. Composiciones para los medios MS, B5 y SH en $mg.L^{-1}$ 18

Tabla 3. Características diferentes sistemas biológicos en suspensión……. 19

Tabla 4. Velocidades de agitación reportadas para diferentes sistemas de cultivo de células vegetales en suspensión a escala de matraz… 20

Tabla 5. Diseño experimental para determinar la mejor relación hormonal para la inducción de callos en *S. tuberosum* var. pastusa suprema…..... 24

Tabla 6. Matriz experimental para el efecto del medio de cultivo, tipo de tapón y velocidad de agitación… 32

Tabla 7. Porcentaje de inducción de callos de *S. tuberosum* bajo diferentes concentraciones hormonales…..... 37

Tabla 8. Composición de los medios MS, SH y B5 por elementos y iones importantes…..... 40

Tabla 9. Cantidad relativa Amonio-Nitrato para los medios utilizados…..... 40

Tabla 10. Efecto del tipo de medio, tipo de tapón y velocidad de agitación sobre el crecimiento de biomasa a los 18 días de crecimiento… 36

Tabla 11. Tipos de tapones y sus efectos sobre varios cultivos de especies vegetales en suspensión….. 46

Tabla 12. Porcentaje de fenolización para algunos tratamientos…..... ……42

Tabla 13. Parámetros cinéticos para cultivos en suspensión de papa obtenidos a partir de la cinética de crecimiento. μ_{max}: tasa específica de crecimiento máxima (h^{-1}), t_d:

$X_{max:}$ concentración de biomasa máxima ($g.L^{-1}$), t : tiempo de duplicación (días),

tiempo de cultivo (días). 43

Tabla 14. Comparación entre μ_{max} y t_d para varios cultivos en suspensión en matraz…..45

Tabla 15. ANOVA sin interacciones para el tipo de tapón, tipo de medio y velocidad de agitación 48

Tabla 16. ANOVA con interacciones para el tipo de tapón, tipo de medio y velocidad de agitación… 47

1. Introducción

El cultivo en suspensión de células vegetales de plantas requiere condiciones de asepsia, el uso de medios de cultivos con composición definida basados en: agua, sales minerales, azúcar, vitaminas y hormonas, estas condiciones libres de patógenos con medios definidos, poblaciones celulares relativamente homogéneas, y las altas tasas de crecimiento celular que permiten tener condiciones altamente reproducibles ideales para la producción comercial de productos de alto valor agregado como metabolitos secundarios o proteínas recombinantes de interés terapéutico (Moscatiello, Baldan y Navazio 2013).

El cultivo de células en suspensión de células vegetales ofrece ciertas ventajas con respecto a otras tecnologías para la producción de productos de alto valor agregado como el cultivo de tejidos o de plantas completas.

- Un ciclo de cultivo de células en suspensión por ejemplo de *S. tuberosum* puede durar dos semanas mientras un ciclo de cultivo de plantas completas puede tardar dos meses (Granger 2016)
- Aunque la expresión transitoria en cultivos de plantas completas ha resultado eficiente para producir pequeñas cantidades de proteínas recombinantes en cortos lapsos (Daniell *et al.* 2005), esta tecnología es difícil de escalar principalmente debido a que la infiltración al vacío en las hojas con *Agrobacterium tumefaciens* o algún otro vector hace de manera manual y en cada ciclo de producción, mientras que las suspensiones celulares se transforman de forma permanente y se suelen obtener a partir de plantas *in vitro* co-cultivadas con *A. tumefaciens* de las que luego se inducen callos en un medio selectivo para las células transformadas y de esta manera se logra inducir suspensiones a partir de los callos transformados (Zagorskaya y Deineko 2017).

- Las plantas completas se cultivan en invernaderos o al aire libre por lo que están expuestas a Fitopatógenos y variaciones en las condiciones ambientales que pueden ser adversas para su desarrollo (Hellwig *et al*. 2004; Rybicki 2010)

Tabla 1. Comparación entre diferentes sistemas vegetales de expresión

Sistema de expresión	Tiempo de producción	Regulaciones
Plantas completas		
Transformación estable	3-6 meses	difícil
Transformación transitoria	2-7 días	moderado
Cultivos *in vitro*		
Suspensiones celulares	7 - 20 días	fácil
Musgo	14 - 13 días	fácil
Raíces peludas	14 - 30 días	fácil

Además, el biorreactor (entendido no solamente como el tanque agitado sino en general como un espacio cerrado en el cual ocurre la reacción de interés y sobre el cual se tiene algún control sobre los flujos de masa y energía) confina los organismos genéticamente modificados a un espacio cerrado lo que minimiza los riesgos de liberación al ambiente de material genéticamente modificado, de igual manera esto previene la contaminación de los cultivos con fitopatógenos y otros microorganismos indeseados del entorno y a diferencia del cultivo en invernaderos el cultivo de células en suspensión en biorreactores permite un control fino de las condiciones físicas y químicas del cultivo como:

- Parámetros químicos: composición del medio, contenido inorgánico, orgánico, hormonas, pH, adición de precursores y otras sustancias.
- Parámetros físicos: iluminación, temperatura, velocidad de agitación, volumen de medio de cultivo, aireación, tiempo de cultivo.

De forma particular el grupo de investigación Biotecnología Vegetal UNALMED-CIB, Código GrupLAC: COL0000962 logró establecer la primera línea de papa transgénica androestéril resistente a *Tecia solanivora (S. tuberosum* variedad Pastusa Suprema) en el mundo (Torres *et al.* 2012). En 2016 junto con el grupo de investigación en Biotecnología industrial (COL0001109) se logró obtener suspensiones celulares de esta variedad transgénica (Granger 2016).

El objetivo de este trabajo fue profundizar en el establecimiento de suspensiones celulares de *S. tuberosum.* En particular se evaluaron condiciones de velocidad de agitación, composición de medio de cultivo y tipo de tapón que beneficiaron la producción de biomasa en cultivos de células en suspensión de *S. tuberosum* a escala de matraz.

2 Estado del arte

21 Influencia de la composición del medio de cultivo en el crecimiento en las suspensiones celulares vegetales

La composición del medio de cultivo es crucial para el crecimiento celular, típicamente las plantas requieren al menos de 14 nutrientes en la cantidad adecuada para su correcto desarrollo, de acuerdo a la cantidad de los nutrientes necesarios en el medio se los clasifica como macro-nutrientes (N, K, Ca, P, Mg, S) o micro-nutrientes (Fe, Ni, Cl, Mn, B, Cu, Mo) (F. George, A. Hall, y De Klerk 2007) y aunque la base de los mecanismos para adquirir estos nutrientes muchas veces es compartida, las plantas desarrollan diferentes mecanismos para la adquisición de nutrientes bajo diferentes ambientes y suelos como fruto de la evolución, por lo que se hace necesario determinar los requerimientos nutricionales específicos de cada variedad vegetal (Maathuis y Diatloff 2013).

Entre los medios de cultivo más utilizados se encuentran el medio MS, B5 y SH (Murashige y Skoog 1962; Yan *et al*. 2009; Schenk y Hildebrandt 1972) y difieren principalmente en cuanto a la cantidad y la fuente de nitrógeno (amonio/nitrato), siendo el medio MS el más abundante en nitrógeno y el B5 el menos abundante, también varían en la composición de algunos de algunos macro y micronutrientes (Tabla 2).

La concentración y la fuente de nitrógeno suministrada tienen un impacto significativo en el crecimiento y producción de las suspensiones celulares vegetales: por ejemplo, niveles reducidos de amonio y altos niveles de nitratos promovieron la producción de ácido gymnémico (Praveen, Murthy y Chung 2011). Cantidades limitantes de nitrógeno en cultivos de *Capsicum annuum* aumentaron la producción capsaicina (Ravishankar *et al.* 1988) , la eliminación completa del nitrato en cultivos de *Chrysanthemum cinerariaefolium* duplicó la acumulación piretrina (Rajashekaran et al. 1991). El aumento de la cantidad de nitrato en el medio de los cultivos transgénicos de tabaco BY-2 multiplicó por 20 la acumulación de

anticuerpos recombinantes (Holland *et al*. 2010). En general se puede favorecer la acumulación de biomasa y la producción de proteínas

recombinantes suministrando la fuente y la cantidad de nitrógeno adecuada y se puede favorecer la acumulación de metabolitos secundarios restringiendo la disponibilidad del nitrógeno.

Tabla 2. Composiciones para los medios MS, B5 y SH en $mg.L^{-1}$

Componente	MS	SH	B5
Macronutrientes			
$(NH_4)_2SO_4$	-	-	134
$MgSO_4.7H_2O$	370	400	250
$CaCl_2.2H_2O$	440	200	150
KNO_3	1900	2500	2500
NH_4NO_3	1650	-	-
$NaH_2PO_4.H_2O$	-	-	150
$NH_4H_2PO_4$	-	300	-
KH_2PO_4	170	-	-
Hierro			
$FeSO_4.7H_2O$	27.8	15	27.8
$Na_2.EDTA$	37.3	20	37.3
Micronutrientes			
$MnSO_4.4H_2O$	22.3	10	10
$ZnSO_4.7H_2O$	8.6	0.1	2
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	0.2	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	0.1	0.025
KI	0.83	0.1	0.75
H_3BO_3	6.2	5	3
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	0.1	0.25
Orgánicos			
Sacarosa	30000	30000	30000
Myo-Inositol	100	1000	100
Ac. Nicotínico	0.5	0.5	1
Piridoxina-HCL	0.5	0.5	1
Tiamina-HCL	1	-	10
Glicina	2	-	-

22 Influencia de la velocidad de agitación en el crecimiento de las suspensiones celulares vegetales.

La velocidad de agitación en los cultivos de células vegetales es un parámetro fìsico del cultivo importante debido a que en ausencia de agitación las células vegetales se sedimentan, lo que limita la transferencia de nutrientes desde el seno del líquido hacia las células, por otro lado una excesiva agitación puede tener consecuencias disruptivas en la integridad de las células rompiendo sus membranas celulares afectando el crecimiento celular.

De manera comparativa con otros sistemas de cultivo de células en suspensión, las células vegetales son más resistentes al estrés hidrodinámico que las células animales a pesar de comúnmente ser más grandes que estas, esto debido a la presencia de pared celular, sin embargo, las células vegetales son menos resistentes al estrés hidrodinámico que las bacterias que también poseen pared celular y tienen un tamaño mucho menor (Tabla 3).

Tabla 3. Características diferentes sistemas biológicos en suspensión, modificado de Kieran *et al*. 1997

Sistema	Tamaño (μm)	Pared celular	Agregados	Consumo de oxígeno Característico ($mmol.L^{-1}.h^{-1}$)
Células vegetales	20-500	si	si	0.1
Células animales	10-20	no	no	0.1
Bacteria	<1	si	si/no	1000

En cultivos de células vegetales en suspensión a escala de matraz se suele trabajar en rangos de velocidad de agitación que van desde 80 hasta 120 rpm (Tabla 4).

Tabla 4. Velocidades de agitación reportadas para diferentes sistemas de cultivo de células vegetales en suspensión a escala de matraz

Velocidad de agitación (rpm)	Sistema biológico	Referencia
100	*Medicago truncatula*	(Iantcheva et al. 2014)
120	*Borojoa patinoi*	(Martínez-Mira 2018)
110	*Thevetia peruviana*	(Arias-Echeverri 2013)
120	*Vanilla planifolia*	(Ramirez-Mosqueda and Iglesias-Andreu 2017)
80	*Stevia rebaudiana*	(Mathur y Shekhawat 2013)
120	*Spilanthes acmella Murr*	(Singh and Chaturvedi 2012)

23 Influencia del tipo de tapón en el crecimiento de las suspensiones celulares vegetales

La oferta de oxígeno es un factor crítico para el correcto funcionamiento metabólico de los organismos aerobios. Los matraces Erlenmeyer son ampliamente utilizados en cultivos de microorganismos y células vegetales y la dinámica de intercambio gaseoso entre el exterior y la columna de gas contenida en el matraz puede afectar significativamente el crecimiento debido a la acumulación de gases como el dióxido de carbono o limitar la disponibilidad de oxígeno en las células, más aún en células vegetales en donde el tipo de tapón puede determinar la acumulación de reguladores de crecimiento como el etileno y la alta viscosidad alcanzada por los cultivos puede limitar la transferencia de oxígeno el seno del cultivo (Andrews y Roberts 2017).

Se han reportado efectos del tipo de tapón sobre el las dinámicas de producción de biomasa y producto en otros cultivos de células vegetales en suspensión: en cultivos *Catharanthus roseus* se reportó la inhibición de la producción de ajmalicina debido a la acumulación de etileno con tapones de *parafilm*, los tratamientos con *parafilm* reportaron una capacidad de retención de gases alta: se midieron reducciones de hasta el 50% de la concentración de oxígeno a largo del cultivo en matraz y altas acumulaciones de etileno, la acumulación de ajmalicina sólo se favoreció con tapones de aluminio (Lee y Shuler 1991) .

por el contrario las células de *Azadirachta indica* en cultivos en suspensión tienen limitaciones para crecer con tapones de aluminio, específicamente en condiciones con poca oferta de oxígeno, siendo los tapones de silicona los más efectivos para el cultivo de estas células (Orozco 2009), contra-intuitivamente por su alta permeabilidad a los gases como el oxígeno, etileno y dióxido de carbono: los tapones de silicona dejan pequeños espacios entre el frasco y el tapón en donde ocurre el intercambio gaseoso con el exterior del frasco (Lee y Shuler 1991).

3 Objetivos

3.1 Objetivo general

Contribuir al establecimiento de una plataforma biotecnológica para la producción de proteínas recombinantes de interés terapéutico a través del cultivo de células en suspensión de la especie *S. tuberosum.*

3.2 Objetivos específicos

Evaluar la composición hormonal y los medios basales MS, SH y B5 que permitan el establecimiento de cultivos de células en suspensión de *Solanum tuberosum* en el menor tiempo posible.

Evaluar el efecto del tipo de tapón y de la velocidad de agitación sobre la producción de biomasa.

4 Metodología

41 Material biológico

4.1.1 Plantas in vitro

Las plantas *S. tuberosum* de la variedad pastusa suprema, pertenecientes a la colección de plantas del grupo de biotecnología vegetal UNALMED-CIB fueron usadas en este trabajo (Torres *et al* 2012).

Las plantas fueron cultivadas *in vitro* en medio Murashige y Skog (MS) suplementado con 30 $g.L^{-1}$ de sacarosa y 2.5 $g.l^{-1}$ Phytagel® (Sigma-Aldrich) y ajustado a pH = 5.8 antes de

esterilizar en autoclave a 120°C, 15 psi por 15 min, iluminación 24 horas al día y 3000 lux de intensidad a una temperatura de 24±3°C (Granger 2016)..

Cada dos meses las plantas se subcultivaron tomando tallos apicales y llevándolos a medio fresco, conservando su polaridad.

4.1.2 Inducción de callos friables

Por su parte, los callos fueron inducidos a partir de entrenudos pequeños (aprox 1mm) los cuales se sembraron en medio MS suplementado con 2mg. L^{-1} de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4 - D), 30g. L^{-1} de sacarosa y 2.5g .L^{-1} de Phytagel® (Sigma-Aldrich) e incubados en oscuridad por 3 semanas a una temperatura de 24±3°C.

Se evaluó el porcentaje de inducción de callos, se probaron tres concentraciones hormonales: 2,4-D 2mg. L^{-1} , Kinetina 1mg. L^{-1} + 2,4-D 3mg .L^{-1} , 2,4-D 5mg .L^{-1} con 10 entrenudos por unidad experimental y 10 repeticiones por unidad experimental de manera simultánea (Tabla 5)

Tabla 5. Diseño experimental para determinar la mejor relación hormonal para la inducción de callos en *S. tuberosum* var. pastusa suprema

2,4-D 2mg. L^{-1}	Kinetina (1mg. L^{-1}) + 2,4-D (3mgL)	2,4-D (5mg. L^{-1})
1.1	2.1	3.1
1.2	2.2	3.2
1.3	2.3	3.3
1.4	2.4	3.4
1.5	2.5	3.5
1.6	2.6	3.6
1.7	2.7	3.7
1.8	2.8	3.8
1.9	2.9	3.9
1.10	2.10	3.10

4.1.3 Establecimiento de suspensiones celulares

Las suspensiones celulares fueron inducidas a partir de callos frescos y friables sin raspar del explante que se llevaron a medio líquido MS, ajustado a un p.H. = 5.8 antes de esterilizar en la autoclave y suplementado con 2 $mg.L^{-1}$ de 2,4–D, estos callos se incubaron por dos semanas en medio líquido a 110 rpm, después se del medio de cultivo mediante decantación y se alimentaron con medio fresco las recién inducidas suspensiones celulares. Estas suspensiones se mantuvieron a 24±3°C y a 110 rpm de agitación en frascos sin bafles de 250mL con 50mL de volumen útil, esto buscando mezclado uniforme. Las suspensiones se subcultivaron cada dos semanas llevando la mitad del medio de cultivo a un frasco con medio fresco.

4.1.4 Efecto del tipo de tapón, composición del medio de cultivo y velocidad de agitación en el crecimiento de biomasa en las suspensiones celulares.

Para evaluar el efecto del tipo de tapón, la composición del medio de cultivo y la velocidad de agitación de manera simultánea se propuso un diseño multifactorial incompleto con efectos fijos en donde la variable respuesta fue el índice de crecimiento IC (Tabla 6). Se evaluaron tres tipos de medio de cultivo: MS, SH y B5 con 2 mg.L^{-1} de 2,4-D.

Las velocidades de agitación (110 y 180 rpm) se escogieron de acuerdo a lo reportado en la Tabla 4, con el objetivo de evaluar una velocidad común para este tipo de cultivos y otra velocidad relativamente alta.

Los tapones usados fueron: algodón previamente pesado a 1g (alto potencial para el intercambio gaseoso), papel aluminio (potencial medio para permitir el intercambio gaseoso) y película plástica de polipropileno o parafilm (potencial bajo para el intercambio gaseoso).

Tabla 6. Matriz experimental para el efecto del medio de cultivo, tipo de tapón y velocidad de agitación

	Factores	Niveles	Unidades
	Tipo de tapón	parafilm algodón aluminio	-
	Medio de cultivo	MS SH B5	-
	Velocidad de agitación	110 180	rpm
	Factor A	**Factor B**	**Factor C**
Unidad experimental*	**Tapón (tipo)**	**Medio**	**rpm**
1	algodón	MS	110
2	parafilm	MS	110
3	aluminio	MS	110
4	algodón	SH	110
5	parafilm	SH	110
6	aluminio	SH	110
7	algodón	B5	110
8	parafilm	B5	110
9	aluminio	B5	110
10	algodón	MS	180
11	parafilm	MS	180
12	aluminio	MS	180
13	algodón	SH	180
14	parafilm	SH	180
15	aluminio	SH	180
16	algodón	B5	180
17	parafilm	B5	180
18	aluminio	B5	180

*Cada unidad experimental se evaluó por triplicado

4.1.5 Cinética de crecimiento

Para determinar los parámetros cinéticos del tratamiento en el que se obtuvo mayor crecimiento celular, se realizó una cinética de crecimiento a temperatura bajo las mejores condiciones de agitación, tipo de medio y tipo de tapón (110 rpm, MS y tapón de algodón) a 24°C por 25 días en matraces de 100 mL con 20 mL de medio MS fresco y 3 mL de inóculo para una concentración inicial aproximada de $1\ g.L^{-1}$ y una velocidad de agitación de 110 rpm. Se realizó un muestreo destructivo cada tres días para obtener la medición de peso seco, cada unidad experimental se compone de tres muestras.

4.2 Métodos analíticos

4.2.1 Peso seco.

El crecimiento celular, a escala de matraz agitado, fue determinado midiendo el peso seco, para lo cual se tomó todo el volumen del cultivo (20 mL) el cual fue filtrado en papel Whatman 595 en una unidad de filtración al vacío; las células retenidas fueron lavadas tres veces con agua destilada y secadas a 60°C en horno de convección por 12 horas.

4.2.2 Pruebas de contaminación para hongos y bacterias

Las pruebas de contaminación para las plántulas y suspensiones celulares se realizaron agregando una alícuota de suspensión en frascos de cultivo con medio PDA en condiciones estériles dentro de la cámara de flujo laminar. Estos frascos se dejaron incubando a 37°C por 24 horas, para luego inspeccionar visualmente en la búsqueda de colonias bacterias y/o halos fúngicos.

4.3 Ecuaciones

4.3.1 Índice de crecimiento (IC)

Para medir el crecimiento de la biomasa se usó el índice de crecimiento (IC), este indicador es conveniente debido a que este se basa en la diferencia entre las concentraciones iniciales y finales de biomasa, por lo nos permite hacer comparaciones entre cultivos que tengan una concentración inicial de biomasa diferente.

$$IC = \frac{C_f - C_i}{C_i} \qquad \textbf{Ecuación 1}$$

En donde C_i es la concentración inicial de biomasa en $g.l^{-1}$

C_f es la concentración final (día 18) de biomasa en $g.l^{-1}$

4.3.2 Velocidad específica de crecimiento μ_{max}

Se calculó como la pendiente de la recta obtenida de graficar

$$ln\frac{x}{x_0}\ vs\ t - t_0 \qquad \textbf{Ecuación 2}$$

Cuando las células están en fase de crecimiento exponencial
En donde $x\ y\ x_0$ son las concentraciones celulares en el tiempo $t\ y\ t_0$ respectivamente

4.3.3 Tiempo de duplicación t_d

Se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$t_d = \frac{ln2}{\mu_{max}} \qquad \textbf{Ecuación 3}$$

44 Análisis estadístico

4.4.1 Índice de crecimiento (IC)

Para medir el crecimiento de la biomasa se usó el índice de crecimiento (IC), este indicador es conveniente debido a que este se basa en la diferencia entre las concentraciones iniciales y finales de biomasa, por lo nos permite hacer comparaciones entre cultivos que tengan una concentración inicial de biomasa diferente.

Para el análisis de los datos arrojados por el diseño multifactorial incompleto con efectos fijos (incompleto se refiere a que no todos los factores tienen la misma cantidad de niveles) se utilizaron dos ANOVA en MATLAB**.** En primer lugar, se realizó un ANOVA sin interacciones entre los factores (tipo de tapón, tipo de medio y velocidad de agitación) para evaluar su efecto sobre el índice de crecimiento por separado.

Después se realizó un ANOVA con interacciones entre los factores para evaluar las interacciones entre ellos y su efecto sobre el índice de crecimiento. Se utilizó un nivel de significancia alfa (α) del 0.05. Para determinar diferencias entre los diferentes tratamientos hormonales para la inducción de callos se calcularon intervalos de confianza del 99.99% para las medias mediante una prueba t-student de una muestra en el software R.

5 Resultados y discusión

5.1 Establecimiento de callos

El tratamiento que mayor crecimiento mostró fue el sometido a 2mg. L^{-1} de 2,4-D (Tabla 7). Los callos producidos se caracterizaron por su alta friabilidad y su coloración blancuzca (Figura 1), este color blancuzco es un buen indicador de la ausencia de compuestos fenólicos que se producen bajo condiciones de estrés, los cuales generan una coloración marrón e inhiben el crecimiento.

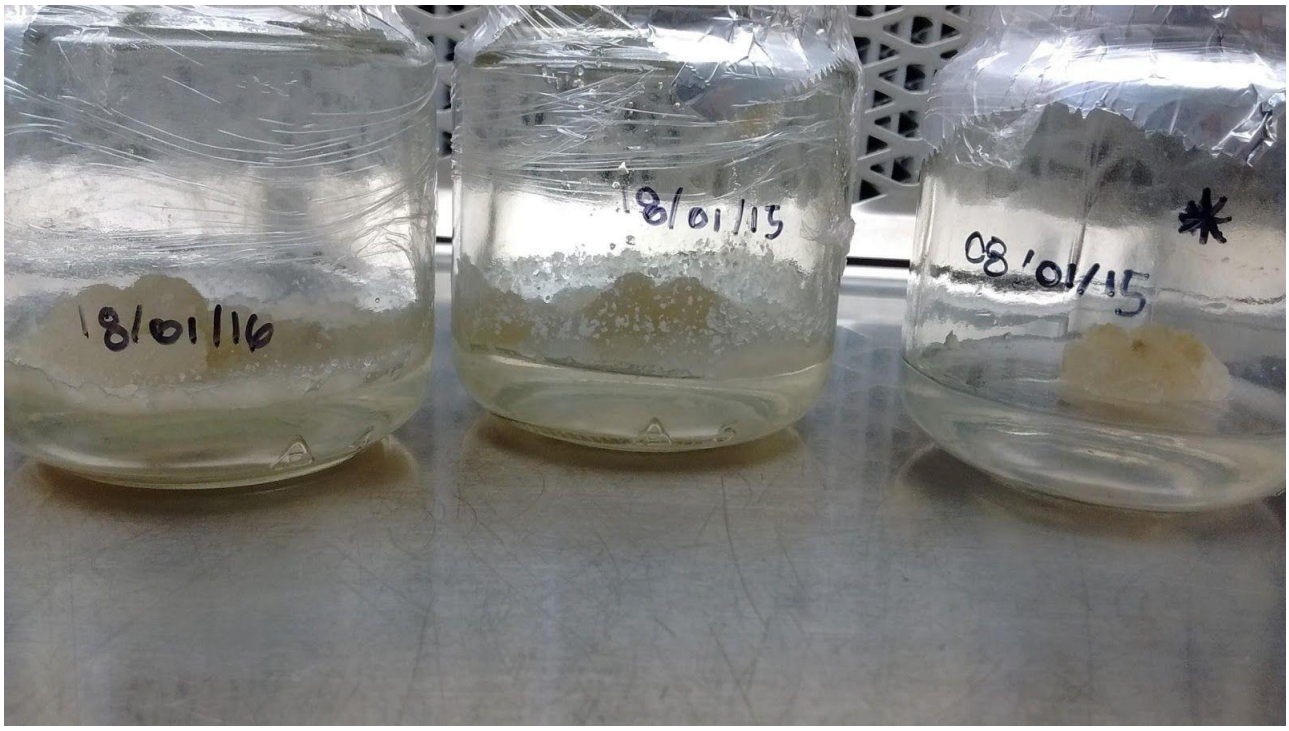


Figura 1. Inducción de callos de *S. tuberosum* a partir de entre nudos en 2mg L^{-1} de 2,4-D.

Tabla 7. Porcentaje de inducción de callos de *S. tuberosum* bajo diferentes concentraciones hormonales

Unidad experimental	2,4-D 2mg. L^{-1}	Kinetina (1mg. L^{-1}) + 2,4-D (3mg. L^{-1})	2,4-D (5mg. L^{-1})
1	90	30	0
2	100	20	0
3	90	20	10
4	80	20	0
5	90	20	0
6	80	30	0
7	100	30	10
8	80	20	0
9	90	30	0
10	90	20	0
Media	89	24	2
Intervalo de confianza (0.0005-0.9995)	77.84 - 100	16.19 - 31.81	0 - 8.37

Anteriormente se reportó la inducción de callos en esta variedad de papa con 1.5mg. L^{-1} de ANA en medio con problemas de fenolización (Granger 2016).

Se logró obtener un protocolo confiable para inducir suspensiones celulares de alta densidad sin problemas de fenolización (Figura 2) reportados en esta misma variedad en medio MS con 0.5 mg. L^{-1} de ANA por (Granger 2016).

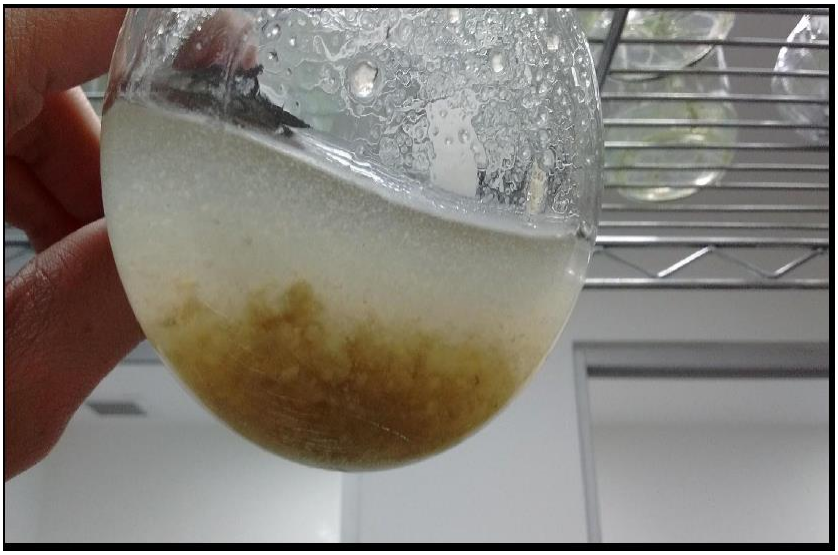


Figura 2. Cultivos en suspensión de *S. tuberosum* en 2mg. L^{-1} de 2,4-D.

52 Efecto del tipo de medio en el crecimiento celular

El crecimiento celular en los tratamientos con medio SH fue muy bajo con índices de crecimiento que variaron entre 0 y 3.01. El bajo crecimiento se pudo observar desde el establecimiento de las suspensiones a partir de los callos: sólo después de múltiples intentos se logró obtener material biológico suficiente para llevar a cabo los experimentos. En contraste, las suspensiones en medio MS y B5 se establecieron rápidamente y mostraron índices de crecimiento entre 2.84 – 4.30 para medio B5 y 5.32 - 15.11 para MS.

El tratamiento que obtuvo un mayor índice de crecimiento fue la unidad experimental tres, con IC = 15.11 y una desviación estándar de 0,91 (Tabla 10), seguido en orden descendente de IC

por la unidad experimental 12, 10 y 2 (Figura 3). El análisis estadístico mostró que únicamente el tipo de medio de cultivo tuvo un valor p menor que 0.05 indicando que fue el único factor que afectó significativamente el IC (Tabla 14).

El medio MS posee 1.6 veces más nitratos que el medio SH y el B5. En cuanto a cantidad de amonio, el medio MS posee 7.7 veces más amonio que el medio SH y 10 veces más que el medio B5 y aunque los medios B5, MS y SH difieren en muchos de sus componentes (Tabla 8) la principal diferencia entre estos medios radica en la cantidad relativa amonio-nitrógeno que poseen (Tabla 9).

Tabla 8. Composición de los medios MS, SH y B5 por elementos y iones Importantes

	MS	SH	B5
MACRONUTRIENTES (mM)			
N O_3	40	25	25
N H_4	20	2.6	2
K	20	25	25.4
Mg	1.5	1.6	1
P O_4	1.25	2.6	1.1
S O_4	1.6	1.6	2.1
Ca	3	1	1
MICRONUTRIENTES (µM)			
Cl	6000	2000	2200
B	100	80	50
Na	202	108	103
Zn	30	3	7
Mn	100	59	60
I	5	0.6	4.5
Mo	1	0.4	1
Co	0.1	0.4	0.1
Cu	0.1	0.08	0.1
Fe	100	54	100

Tabla 9. Cantidad relativa Amonio-Nitrato para los medios utilizados

	AMONIO	NITRATO
MS/B5	10	1,6
MS/SH	7,7	1,6
SH/B5	1.25	1

El medio SH que posee un 25% más de amonio que el medio B5 obtuvo un menor IC y muchos tratamientos sin crecimiento o fenolizados.

Todo esto sugiere que la razón por la que hubo un IC mayor en el medio MS fue por su elevada concentración de nitrógeno en particular de nitratos.

Tabla 10. Efecto del tipo de medio, tipo de tapón y velocidad de agitación sobre el crecimiento de biomasa a los 18 días de crecimiento

	Factor A	Factor B	Factor C	Variable respuesta	
Unidad experimental	**Tapón (tipo)**	**Medio**	**rpm**	**IC (promedio)**	**Desviación estándar**
1	algodón	MS	110	NC*	NC*
2	parafilm	MS	110	5.32	1.42
3	aluminio	MS	110	15.11	0.91
4	algodón	SH	110	NC*	NC*
5	parafilm	SH	110	3.01	0.08
6	aluminio	SH	110	NC*	NC*
7	algodón	B5	110	NC*	NC*
8	parafilm	B5	110	4.12	0.73
9	aluminio	B5	110	4.30	0.46
10	algodón	MS	180	5.40	3.11
11	parafilm	MS	180	NC*	NC*
12	aluminio	MS	180	8.00	0.96
13	algodón	SH	180	2.96	0.29
14	parafilm	SH	180	NC*	NC*
15	aluminio	SH	180	NC*	NC*
16	algodón	B5	180	NC*	NC*
17	parafilm	B5	180	2.84	0.58
18	aluminio	B5	180	3.30	0.18

*NC: tratamientos sin información se fenolizaron completamente y/o no presentaron crecimiento visible

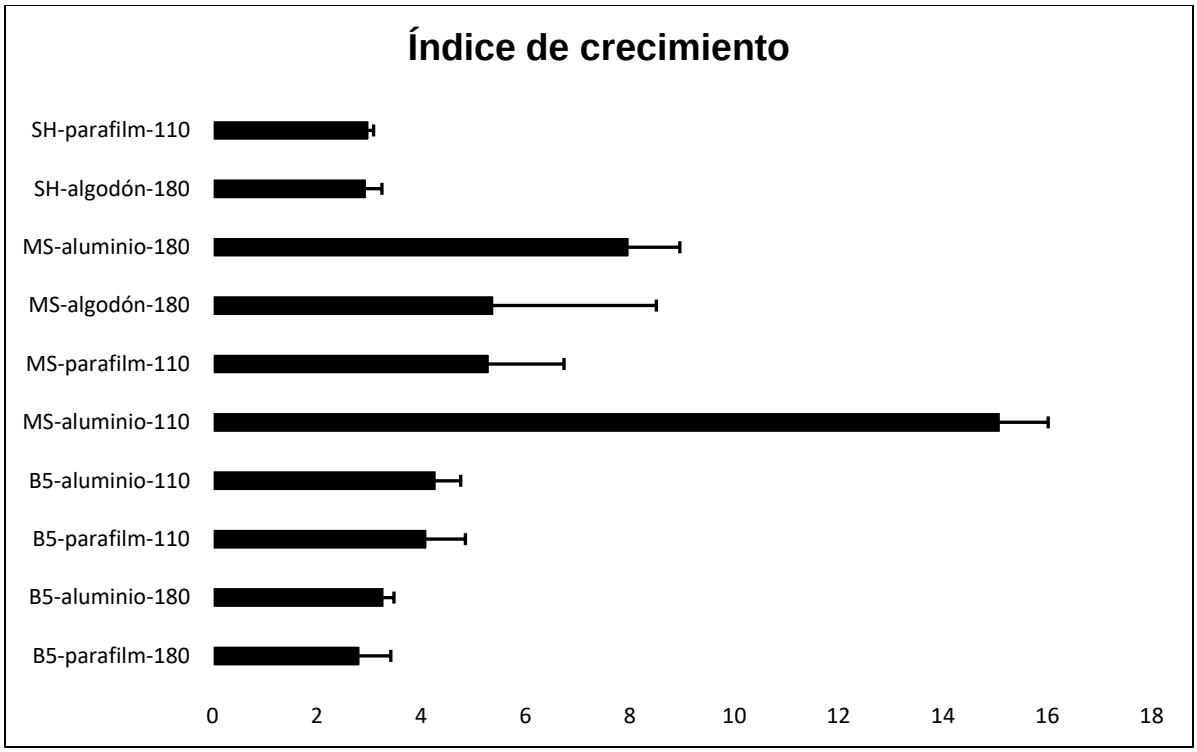


Figura 3. Índices de crecimiento reportados para las diferentes combinaciones para el tipo de tapón, composición del medio y velocidad de agitación (rpm).

*Las barras de error indican la desviación estándar

5.3 Efecto del tipo de tapón en el crecimiento celular

La mayoría de los cultivos a los cuales se les aplicó tapón de algodón se pardearon y no crecieron (Figuras 4 y 5), en contraste con los tratamientos con tapón de aluminio y parafilm que mostraron ICs de 3.30 – 15.11 para aluminio y 2.84 y 5.32 para parafilm (Tabla 10). El análisis estadístico solamente mostró un efecto significativo del tipo de tapón en el ANOVA con interacciones (Tabla 15), aunque el 67% de los tratamientos sometidos a tapón de algodón se pardearon y pararon de crecer.

Entre los tapones evaluados, los extremos en cuanto a permeabilidad de gases son *parafilm* (menos permeable) y algodón (más permeable), siendo el tapón intermedio (aluminio) el que mejores resultados obtuvo. Esto sugiere la posibilidad de que los cultivos de *S.tuberosum* desarrollados aquí podrían ser sensibles al exceso de oferta de oxígeno, pero podrían verse inhibidos por la acumulación de gases como el dióxido de carbono o el etileno. Sin embargo,

para tener idea de esto sería necesario hacer mediciones de la cantidad y el tipo de gases presentes en la columna de gas del matraz.

Se han reportado efectos del tipo de tapón sobre el las dinámicas de producción de biomasa y producto en otros cultivos de células vegetales en suspensión, se reportó la inhibición de la producción de ajmalicina debido a la acumulación de etileno con tapones de *parafilm* en cultivos *Catharanthus roseus* (Lee y Shuler 1991) , los tratamientos con *parafilm* reportaron una capacidad de retención de gases alta: se midieron reducciones de hasta el 50% de la concentración de oxígeno a largo del cultivo en matraz y altas acumulaciones de etileno.

En trabajos anteriores de demostró que las células de *Azadirachta indica* en cultivos en suspensión tienen limitaciones para crecer con tapones de aluminio, específicamente en condiciones con poca oferta de oxígeno, siendo los tapones más efectivos para el cultivo de estas células los tapones de silicona, en donde se obtuvo mediciones más altas de oferta de oxígeno en los tapones de silicona que en los de algodón (Orozco 2011). Los tapones de silicona dejan pequeños espacios entre el frasco y el tapón en donde ocurre el intercambio gaseoso con el exterior del frasco no por su alta permeabilidad a los gases como el oxígeno, etileno y dióxido de carbono (Lee y Shuler 1991).

Se ha encontrado cultivos con una demanda de oxígeno menor, en 2013 se encontró evidencia de que los tapones de algodón y de aluminio no presentaban diferencias en la producción de biomasa en cultivos de *Thevethia peruviana* (Arias Echeverri 2013), en 2018 se reportaron cultivos en suspensión de *Borojoa patinoi* en donde no se encontró diferencia en el crecimiento entre los cultivos con tapones de aluminio, algodón y espuma de poliuretano (Martínez Mira 2018) (Tabla 11)

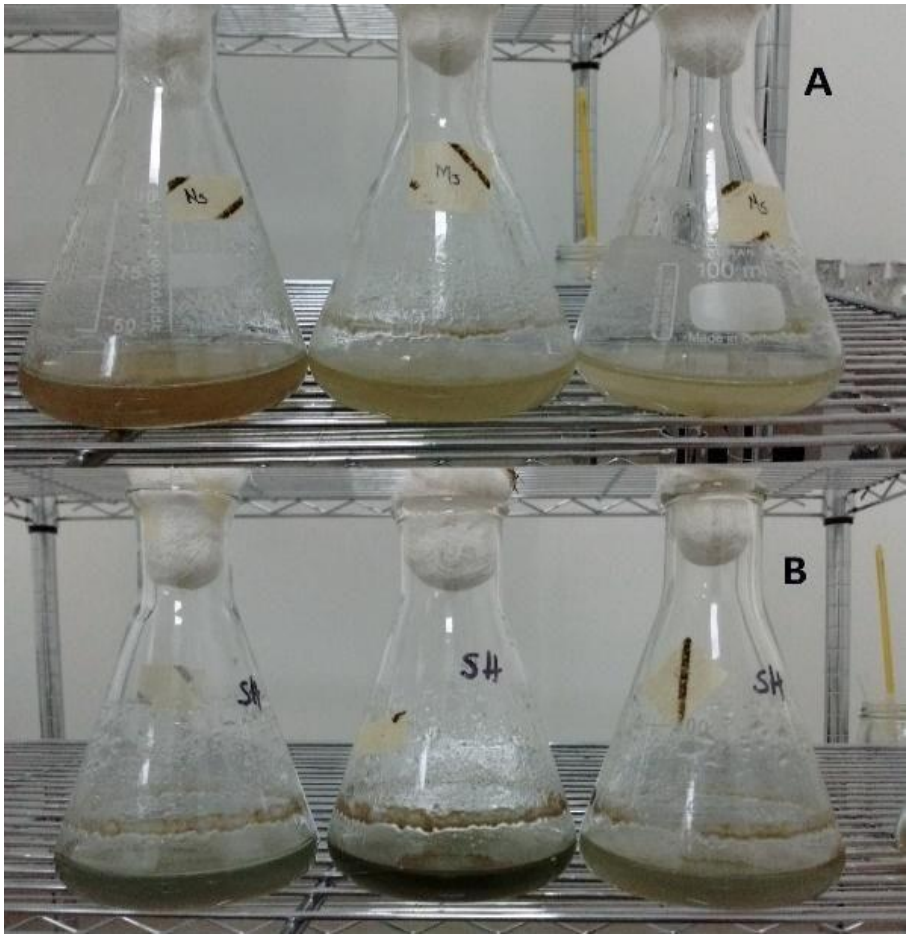
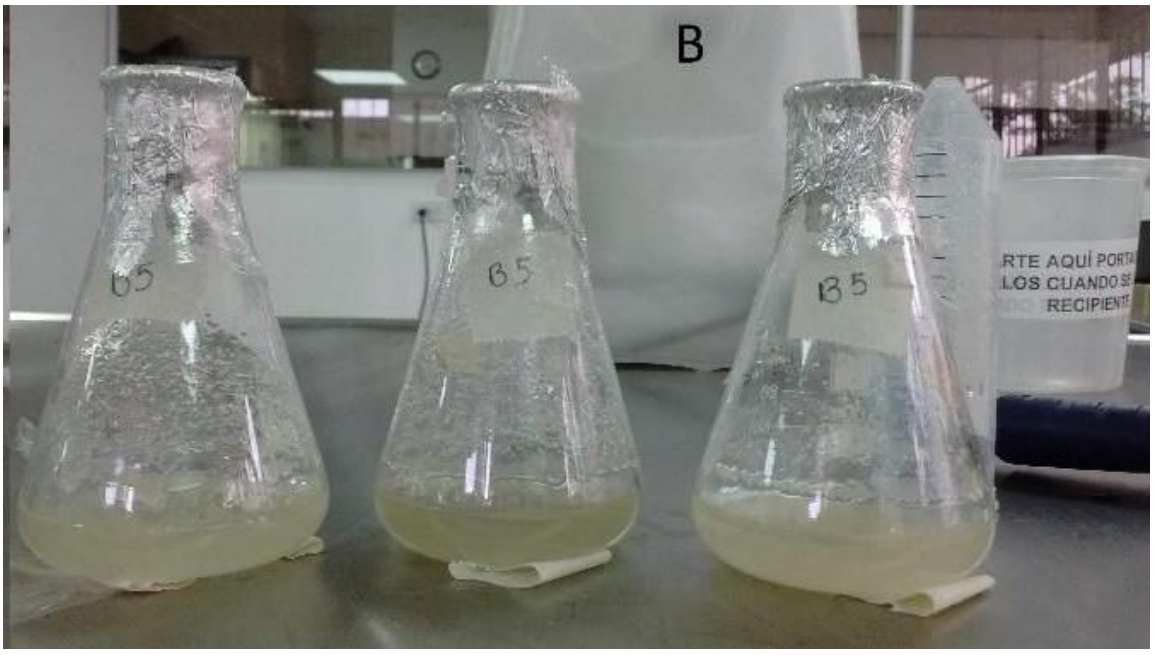


Figura 4. Cultivos fenolizados con tapón de algodón. A: Cultivos en medio MS con tapón de algodón, B Cultivos en medio SH.

A
B5
B5
B5


B
B5
B5
B5

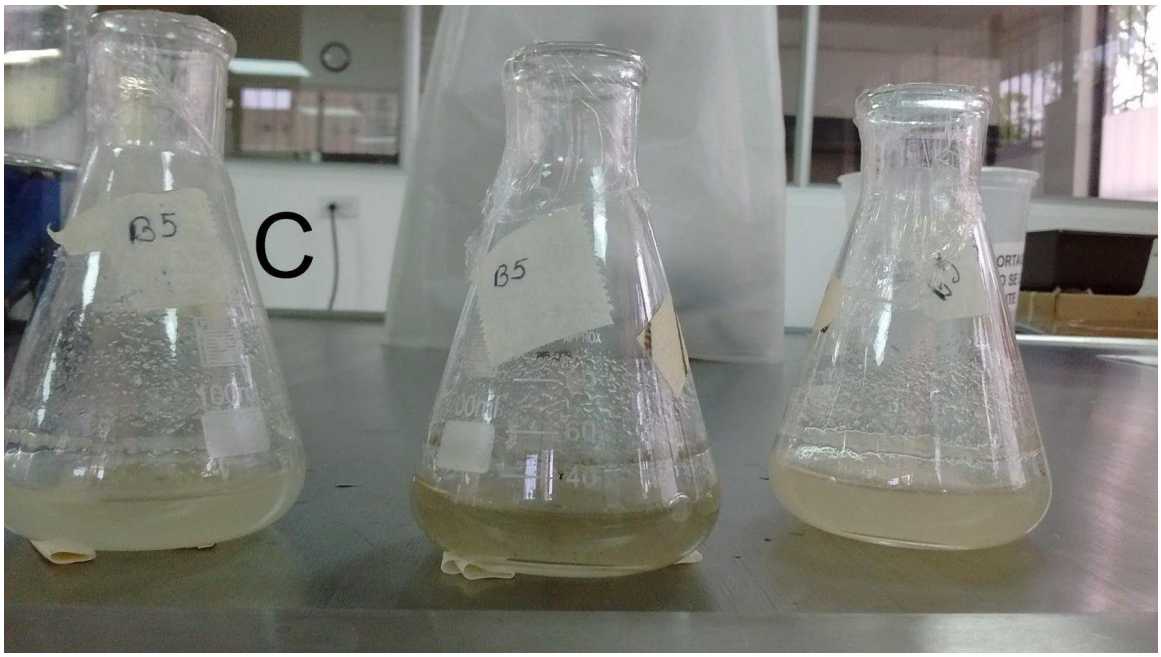


Figura 5. Comparación entre cultivos sometidos a 110rpm y medio B5 A. Con tapón de algodón B. Tapón de aluminio C. Tapón de parafilm.

Tabla 11. Tipos de tapones y sus efectos sobre varios cultivos de especies vegetales en suspensión

Variedad vegetal	Tipo de tapones	Efecto	Referencia
Catharanthus roseus	parafilm-aluminio -silicona	la acumulación de etileno inhibe la producción de ajmalicina	(Srivastava *et al*. 2009)
Azadirachta indica	silicona-aluminio-algodón	la alta oferta de oxígeno promueve el crecimiento celular	(Orozco 2011)
Borojoa patinoi	silicona - algodón-aluminio	sin diferencia	(Martínez-Mira 2018)
Thevetia peruviana	silicona - algodón-aluminio	sin diferencia	(Arias-Echeverri 2013)
Solanum tuberosum	algodón-parafilm-aluminio	el algodón Inhibe el crecimiento y promueve la fenolización, mejor resultado con tapón de aluminio.	este trabajo.

5.4 Efecto de la velocidad de agitación sobre el crecimiento celular

Los tratamientos sometidos a 110 rpm presentaron ICs de 3.01 – 15.11 contrastando con los resultados obtenidos en los tratamientos sometidos a 180 rpm en donde se encontraron ICs del orden de 2.96 – 8.00 (Tabla 10). Sin embargo, el análisis estadístico sólo mostró un efecto significativo de la velocidad de agitación cuando interactúa con el factor medio de cultivo (Tabla 15).

5.5 Pardeamiento celular

Varios tratamientos cuya respuesta de crecimiento fue negativa, cambiaron de color blancuzco a marrón e incluso verde-azulado, presumiblemente gracias a la presencia de compuestos fenólicos (Figuras 4 y 6). Es de resaltar que a estos tratamientos cuya respuesta fue negativa se les realizó un cultivo en PDA por triplicado para descartar contaminación por hongos o bacterias.

Este cambio de coloración en los cultivos *in vitro* ha sido ampliamente documentado y generalmente se atribuye al cambio de coloración que provocan los compuestos fenólicos cuando se oxidan y forman quinonas que por lo general tienen coloraciones marrones, violetas, rojas e incluso verdes cuando interactúan y forman complejos con metales como el hierro (Soloway y Wilen 1952; Broumand y Smith 1952) (Figura 6). Las quinonas son altamente reactivas y pueden tener un efecto disruptivo en la actividad enzimática de la célula llevándola a la muerte, esto como parte como parte de la respuesta generalizada al estrés que poseen las células vegetales (Boscaiu et al. 2010).

La fenolización de los cultivos puede estar causada por una multitud de factores entre los que se encuentran: corte de explantes, estrés hidrodinámico en los cultivos líquidos, inadecuada composición del medio de cultivo, la edad de los cultivos (Bhat y Chandel 1991), e incluso variación epigenética. Esta última toma notable importancia en los cultivos *in-vitro* en suspensión debido a que refleja los procesos de adaptación de las células a las condiciones

de cultivo *in-vitro*. Los cambios provocados por adaptaciones epigenéticas en los cultivos de células vegetales son considerables debido a la desdiferenciación celular y pueden tener efectos indeseados. Los mecanismos epigenéticos y sus efectos en los cultivos *in-vitro* aún están lejos de ser totalmente comprendidos (Miguel y Marum 2011).

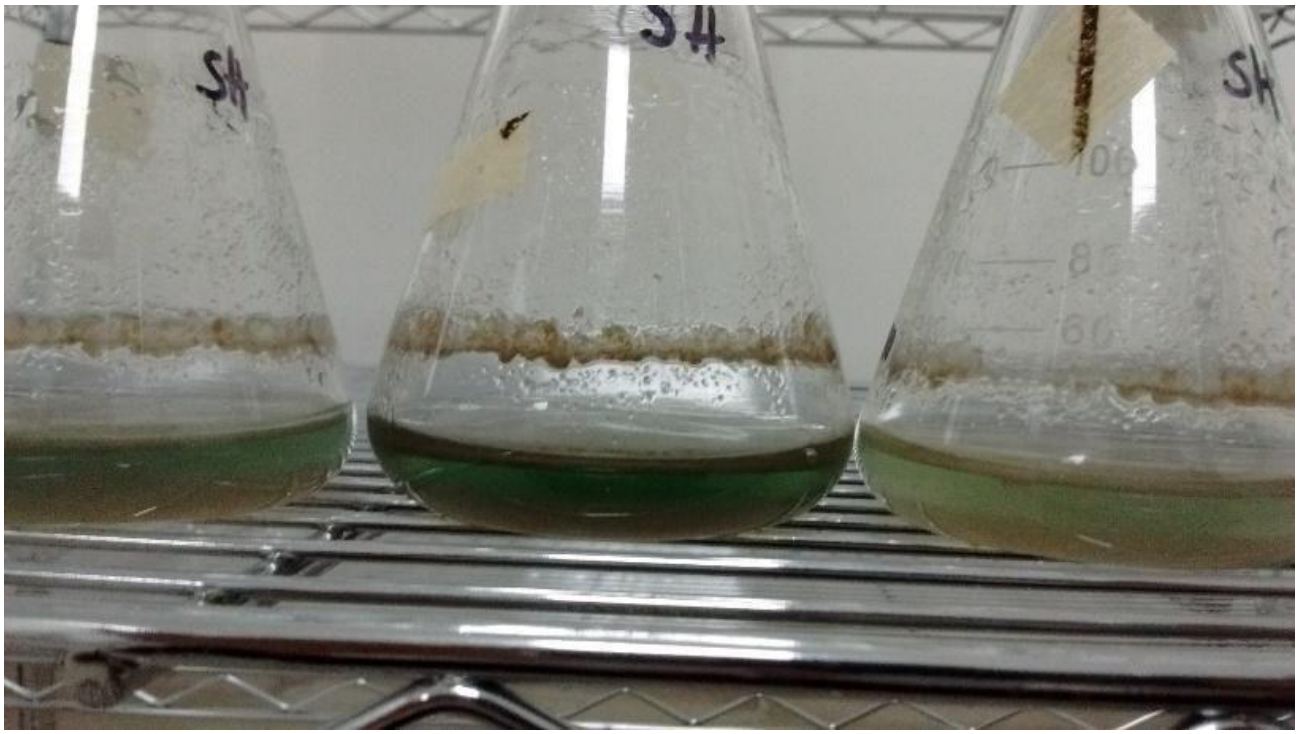


Figura 6. Cultivos en medio SH que cambiaron de color y dejaron de crecer.

El pardeamiento celular aparentemente errático se ha reportado en cultivos de *Taxus chinensis* (Wickremesinhe y Arteca 1994), e incluso en cultivos en suspensión de esta misma variedad de *S. tuberosum* (Granger 2016).

A pesar de que el análisis estadístico identificó el tipo de medio de cultivo como ùnico factor significativo, El 67% de los tratamientos sometidos a medio SH, el 56% de los tratamientos mantenidos a 180 rpm y el 67% de los tratamientos sometidos a tapón de algodón no crecieron en lo absoluto, contrastando por ejemplo con sólo el 33% de tratamientos sometidos a medio MS, el 44% de tratamientos mantenidos a 110 rpm y el 33% de los tratamientos sometidos a tapón de aluminio que no presentaron crecimiento alguno (Tabla 11). sugiriendo

que las condiciones de tapón algodón, 180rpm y medio SH son extremas y desfavorables para el crecimiento de los cultivos en suspensión de *S. tuberosum.*

Tabla 12. Porcentaje de fenolización para algunos tratamientos

Algodón	180 rpm	SH
67%	56%	67%
Aluminio	**110**	**MS**
33%	44%	33%

5.6 Cinética de crecimiento

Para validar los mejores resultados obtenidos en la unidad experimental tres con un IC de 15.11 y una concentración máxima de biomasa X_{max} de 16.76 $g.L^{-1}$ se realizó una cinética de crecimiento bajo las siguientes condiciones de cultivo: tapón de aluminio, medio MS y 110 rpm.

La curva de crecimiento (Figura 7) muestra una fase de latencia del día cero al día cuatro. Del día 4 al día 15 se observa la fase exponencial en donde las células crecen a la velocidad máxima y se obtiene el máximo rendimiento de biomasa en sustrato, a partir del día 15 hasta el 21 se observa la fase estacionaria en donde la velocidad de crecimiento de las células permanece relativamente constante. En la fase estacionaria hay un decrecimiento de la velocidad de crecimiento de las nuevas células, probablemente debido debido a la alta densidad celular que impide la transferencia de oxígeno y nutrientes al interior del fluido del frasco y/o debido al agotamiento de los recursos del medio, principalmente la fuente de carbono, a partir del día 21 se identifica la fase de muerte celular en la cual la concentración de células disminuye.

La concentración máxima de biomasa $15.67 g.L^{-1}$ fue coherente con el resultado de la unidad experimental tres que alcanza una concentración de 16.76 $g.L^{-1}$ (Tabla 10).

La velocidad específica de crecimiento y el tiempo de duplicación calculados son comparables en orden de magnitud con otros resultados obtenidos en otros estudios relacionados al establecimiento de suspensiones vegetales.

En esta misma variedad de *S. tuberosum* (Pastusa suprema) se reportó suspensiones con 0.5 mg. L^{-1} de ANA, con tiempos de duplicación 4.47 veces menores al reportado en este trabajo usando 2mg. L^{-1} de 2,4 -D (Granger 2016)

Tabla 13. Parámetros cinéticos para cultivos en suspensión de papa obtenidos a partir de la cinética de crecimiento. μ_{max}: **tasa específica de crecimiento máxima** (dia^{-1}), t_d **: tiempo de duplicación (días),** X_{max}: **concentración de biomasa máxima (** $g.L^{-1}$**),** t : **tiempo de cultivo (días)**

μ_{max}	t_d	X_{max}	t	R^2
0.38	1.82	15.67	24	0.988

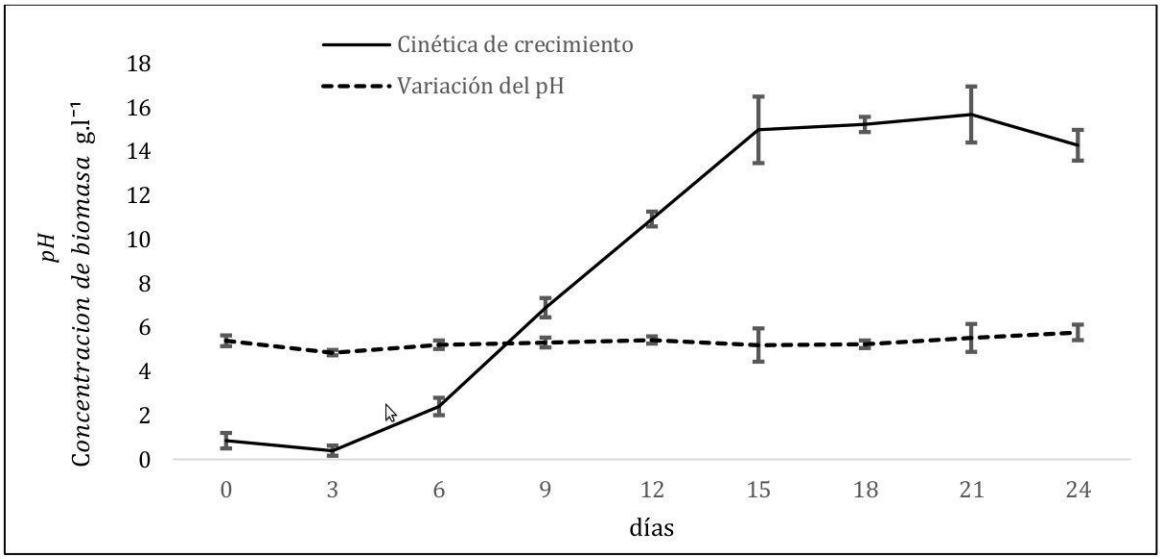


Figura 7. Cinética de crecimiento y dinámica del pH realizada a 110 rpm, con medio MS y con tapón de aluminio.

Tabla 14. Comparación entre μ_{max} y t_d para varios cultivos en suspensión en matraz

μ_{max} (dia^{-1})	t_d **(días)**	**Volumen de trabajo (ml)**	**Variedad**	**Referencia**
0.38	1.82	20	*Solanum tuberosum*	este trabajo
0.37	1.87	20	*Perilla frutenses*	Zhong y Yoshida 1993
0.12	5.77	70	*Fragaria ananassa*	Hong, Labuza y Harlander 1989
0.12	5.77	20	*Solanum tuberosum*	Nova *et al*. 2017
0.39	1.78	250*	*Helianthus annuus*	Geipel *et al*. 2013
0.267	2.60	10	*Helianthus annuus*	Werner *et al*. 2014
0.09	7.50	25	*Jatropha curcas*	Bernabe-Antonio *et al*. 2015
0.11	6.50	20	*Borojoa patinoi*	Martínez-Mira 2018
0.085	8.15	20	*Solanum tuberosum*	Granger 2016
0.215	3.22	250*	*Thevetia peruviana*	Arias-Echeverri 2013
0.24	2.88	30	*Tribulus terrestris*	Khandy *et al*. 2017

**Volumen total*

6 Conclusiones y recomendaciones

Se logró desarrollar una metodología para la inducción de callos y suspensiones celulares de *Solanum tuberosum* spp. andígena basada en la adición de 2mg. L^{-1} de 2,4 -D en el medio de cultivo, Superando en parte los problemas de fenolización y los tiempos de duplicación reportados anteriormente en esta misma variedad (Granger 2016)

Según el análisis estadístico el medio de cultivo fue el único factor que influyó significativamente en la variación del IC, el medio que mejor resultado obtuvo fue el MS que se caracteriza por tener nutrientes en exceso y en especial por tener una mayor cantidad de nitrato y amonio que los medios SH y B5. El tipo de tapón y la velocidad de agitación tuvieron un efecto significativo en la variación del IC solamente en el ANOVA con interacciones (Tabla
15) .

El crecimiento celular los cultivos de *S. tuberosum* desarrollados en este estudio alcanzó tiempos de duplicación y velocidades específicas de crecimiento similares a otros cultivos de suspensiones vegetales mostrando su potencial como plataforma biotecnológica.

Este estudio sirvió para determinar las condiciones de cultivo y para plantear la inquietud acerca del efecto positivo en la concentración de nitrato en el crecimiento celular que posteriormente fue comprobada en otro estudio en esta misma variedad variedad en donde se reportó aumentos de biomasa en las suspensiones celulares de hasta 193% cuando se aumentó la concentración de nitrato en cultivos de la variedad pastusa suprema transformada genéticamente (Nova *et al* 2017).

7 Anexos

7.1 Análisis estadístico

Para identificar las combinaciones de factores que afectaron significativamente el IC se hizo un ANOVA con interacciones. Sólo las combinaciones con el factor B (medio de cultivo) es decir: solamente C*B (rpm*medio) y A*C (medio*tapón) mostraron diferencias significativas en el índice de crecimiento, resultado coherente con el ANOVA sin interacciones en donde se encontró que el único factor que influyó significativamente en el crecimiento fue el tipo de medio de cultivo (Tabla 14). Esto sugirió que las células en suspensión de *S. tuberosum* fueron altamente sensibles a la composición del medio de cultivo,

Es de resaltar que gracias al diseño experimental planteado que propone evaluar de manera simultánea los efectos de la velocidad de agitación, el medio de cultivo y la velocidad de agitación, permite identificar interacciones entre estos parámetros que de analizarse por separado (Fischer *et al.* 2015).

Tabla 15. ANOVA sin interacciones para el tipo de tapón, tipo de medio y velocidad de agitación

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl *	Media de Cuadrados	F experimental	Valor p
A:tapón	26,695	1	9,0325	1,48	0,2419
B:medio	80,344	3	26,7813	4,38	0,0197
C:rpm	9,032	2	13,3475	2,18	0,1451
error	97,842	16	6,1151	-	-
total	216,134	22	-	-	-

*grados de libertad

Tabla 16. ANOVA con interacciones para el tipo de tapón, tipo de medio y velocidad de agitación

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl*	Media de Cuadrados	F experimental	Valor p*
C*B:(rpm*medio)	22,188	1	22,1879	6,83	0,0226
C*A(rpm*tapón)	0,141	1	0,1411	0,04	0,8384
B*A:(medio*tapón)	46,698	1	46,6985	14,38	0,0026
error	38,971	12	3,2476	-	-
total	216,134	22	-	-	-

*grados de libertad

8 Bibliografía

Andrews, Gregory R, and Susan C Roberts. 2017. “Bioprocess Engineering of Plant Cell Suspension Cultures.” *Applied Bioengineering: Innovations and Future Directions* 5.

Arias-Echeverri, Juan Pablo 2014. “Optimización de Parámetros de Cultivo En Suspensión de Células de La Especie Vegetal *Thevetia Peruviana* y Su Efecto En La Producción de Metabolitos Secundarios.” Msc. Tesis, Universidad Nacional de Colombia, Medellín.

Aslam, Junaid, Sheba Haque Khan, Zahid Hameed Siddiqui, Zohra Fatima, Mehpara Maqsood, Mukthar Ahmad Bhat, Sekh Abdul Nasim. 2010. “*Catharanthus Roseus* (L.) G. Don. An Important Drug: It’s Applications and Production.” *Pharmacie Globale (IJCP)* 4 (12): 1–16.

Bentebibel, Salima, Elisabet Moyano, Javier Palazón, Rosa M Cusidó, Mercedes Bonfill, Regine Eibl, y M Teresa Pinol. 2005. “Effects of Immobilization by Entrapment in Alginate and Scale-up on Paclitaxel and Baccatin III Production in Cell Suspension Cultures of Taxus Baccata.” *Biotechnology and Bioengineering* 89 (6): 647–655.

Bhat, S R, and K P S Chandel. 1991. “A Novel Technique to Overcome Browning in Tissue Culture.” *Plant Cell Reports* 10 (6–7): 358–361.

Boscaiu, Monica, María Sánchez, Inmaculada Bautista, Pilar Donat, Antonio Lidón, Josep Llinares, Cristina Llul, Olga Mayoral, y Oscar Vicente. 2010. “Phenolic Compounds as Stress Markers in Plants from Gypsum Habitats.” *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Horticulture* 67 (1): 44–49.

Broumand, Hormoz, y J Harold Smith. 1952. “Composition of the Complexes of Iron (III) with Phenols and Enols1.” *Journal of the American Chemical Society* 74 (4): 1013–1016.

Daniell, Henry, Seethamahalakshmi Chebolu, Shashi Kumar, Michael Singleton, y Regina Falconer. 2005. “Chloroplast-Derived Vaccine Antigens and Other Therapeutic Proteins.” *Vaccine* 23 (15): 1779–1783.

DiCosmo, Frank, y Masanaru Misawa. 1996. *Plant Cell Culture Secondary Metabolism Toward Industrial Application*. CRC Press.

Gamborg, O L, T Murashige, T A Thorpe, and I K Vasil. 1976. “Plant Tissue Culture Media.” *In Vitro* 12 (7): 473–478.

George, Edwin F, Michael A Hall, y Geert-Jan De Klerk. 2008. “The Components of Plant Tissue Culture Media I: Macro-and Micro-Nutrients.” In *Plant Propagation by Tissue Culture*, 65–113. Springer.

Granger-Serrano, L. F. “Evaluación del potencial del cultivo de células en suspensión de papa (Solanum tuberosum subsp. andígena) como plataforma de producción de proteínas recombinantes”. Msc. Tesis, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

Kieran, P. M., MacLoughlin, P. F., & Malone, D. (1997). Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *Journal of Biotechnology*, *59*(1-2), 39-52.

Hellwig, Stephan, Jurgen Drossard, Richard M Twyman, and Rainer Fischer. 2004. “Plant Cell Cultures for the Production of Recombinant Proteins.” *Nature Biotechnology* 22 (11): 1415–1422. https://doi.org/10.1038/nbt1027.

Holland, T, M Sack, T Rademacher, K Schmale, F Altmann, J Stadlmann, R Fischer, y S Hellwig. 2010. “Optimal Nitrogen Supply as a Key to Increased and Sustained Production of a Monoclonal Full-Size Antibody in BY-2 Suspension Culture.” *Biotechnology and Bioengineering* 107 (2): 278–289.

Huang, Jianmin, Liying Wu, Dorice Yalda, Yuriko Adkins, Shannon L Kelleher, Michael Crane, Bo Lonnerdal, Raymond L Rodriguez, and Ning Huang. 2002. “Expression of Functional Recombinant Human Lysozyme in Transgenic Rice Cell Culture.” *Transgenic Research* 11 (3): 229–239.

Iantcheva, A., Revalska, M., Zehirov, G., & Vassileva, V. (2014). Agrobacterium-mediated transformation of Medicago truncatula cell suspension culture provides a system for functional analysis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, *50*(2), 149-157.

Larrick, James W, Lloyd Yu, Clarissa Naftzger, Sudhir Jaiswal, and Keith Wycoff. 2001. “Production of Secretory IgA Antibodies in Plants.” *Biomolecular Engineering* 18 (3): 87–94.

Lee, Carolyn W T, y Michael L Shuler. 1991a. “Different Shake Flask Closures Alter Gas Phase Composition and Ajmalicine Production in Catharanthus Roseus Cell Suspensions.” *Biotechnology Techniques* 5 (3): 173–178.

Lee, C. W., y Shuler, M. L. (1991). Different shake flask closures alter gas phase composition and ajmalicine production in Catharanthus roseus cell suspensions. *Biotechnology techniques*, *5*(3), 173-178.

Nova-López, Carlos Julio, Jorge Mario Muñoz Pérez, Luisa Fernanda Granger Serrano,

Mario Evelio Arias Zabala, and Rafael Eduardo Arango Isaza. 2017. “Expression Ofrecombinant Cry 1Ac Protein in Potato Plant Cell Suspension Culture:: Establishment of Culture and Optimization of Biomass and Protein Production by Nitrogen Supply.” *DYNA: Revista de La Facultad de Minas. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medell{$\backslash$’$\backslash$i}n* 84 (201): 34–41.

Maathuis, Frans J M, y Eugene Diatloff. 2013. “Roles and Functions of Plant Mineral Nutrients.” In *Plant Mineral Nutrients*, 1–21. Springer.

Mathur, S., & Shekhawat, G. S. (2013). Establishment and characterization of Stevia rebaudiana (Bertoni) cell suspension culture: an in vitro approach for production of stevioside. *Acta Physiologiae Plantarum*, *35*(3), 931-939.

Martínez-Mira, Anny Daniela. “Cultivo de Células En Suspensión de Borojoa Patinoi Para La Producción de Compuestos Con Potencial Citotóxico y Genotóxico.” Msc. Tesis, Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín.

Miguel, Célia, and Liliana Marum. 2011. “An Epigenetic View of Plant Cells Cultured in Vitro: Somaclonal Variation and Beyond.” *Journal of Experimental Botany* 62 (11): 3713–3725.

Moscatiello, Roberto, Barbara Baldan, and Lorella Navazio. 2013. “Plant Cell Suspension Cultures.” In *Plant Mineral Nutrients*, 77–93. Springer.

Murashige, Toshio, and Folke Skoog. 1962. “A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures.” *Physiologia Plantarum* 15 (3): 473–497.

Murthy, Hosakatte Niranjana, Eun-Jung Lee, and Kee-Yoeup Paek. 2014. “Production of Secondary Metabolites from Cell and Organ Cultures: Strategies and Approaches for Biomass Improvement and Metabolite Accumulation.” *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 118 (1): 1–16.

Orozco Sánchez, Fernando. 2009. “Efecto de La Oferta de Oxígeno Sobre El Crecimiento y La Producción de Terpenoides Con Células de Azadirachta Indica En Un Biorreactor.” PhD Thesis.

Orozco-Sanchez, F, G Sepúlveda-Jiménez, G Trejo-Tapia, A Zamilpa, and M Rodr$\backslash$’$\backslash$iguez-Monroy. 2011. “Oxygen Limitations to Grow Azadirachta Indica Cell Culture in Shake Flasks.” *Revista Mexicana de Ingeniería química* 10 (3).

Praveen, N, H N Murthy, y I M Chung. 2011. “Improvement of Growth and Gymnemic Acid Production by Altering the Macro Elements Concentration and Nitrogen Source

Supply in Cell Suspension Cultures of Gymnema Sylvestre R. Br." *Industrial Crops and Products* 33 (2): 282–286.

Rajasekaran, T, L Rajendran, G A Ravishankar, and L V Venkataraman. 1991. "Influence of Nutrient Stress on Pyrethrin Production by Cultured Cells of Pyrethrum (Chrysanthemum Cinerariaefolium)." *Current Science*, 705–707.

Ramírez-Mosqueda, M. A., Iglesias-Andreu, L. G., & Bautista-Aguilar, J. R. (2017). The effect of light quality on growth and development of in vitro plantlet of Stevia rebaudiana Bertoni. *Sugar Tech*, *19*(3), 331-336.

Raven, Nicole, Stefan Rasche, Christoph Kuehn, Tibor Anderlei, Wolf Klöckner, Flora Schuster, Maurice Henquet 2015. "Scaled-up Manufacturing of Recombinant Antibodies Produced by Plant Cells in a 200-L Orbitally-Shaken Disposable Bioreactor." *Biotechnology and Bioengineering* 112 (2): 308–321.

Ravishankar, G A, K S Sarma, L V Venkataraman, y A K Kadyan. 1988. "Effect of Nutritional Stress on Capsaicin Production in Immobilized Cell Cultures of Capsicum Annuum." *Current Science* 57 (7): 381–383.

Rybicki, Edward P. 2010. "Plant-Made Vaccines for Humans and Animals." *Plant Biotechnology Journal* 8 (5): 620–637.

Schenk, Roy U, y A C Hildebrandt. 1972. "Medium and Techniques for Induction and Growth of Monocotyledonous and Dicotyledonous Plant Cell Cultures." *Canadian Journal of Botany* 50 (1): 199–204.

Shaaltiel, Yoseph, Sharon Hashmueli, Daniel Bartfeld, Gideon Baum, Tal Ratz, Einat Mizrachi, y Yehava Forester. 2012. *System and Method for Production of Antibodies in Plant Cell Culture*. Google Patents.

Singh, M., & Chaturvedi, R. (2012). Screening and quantification of an antiseptic alkylamide, spilanthol from in vitro cell and tissue cultures of Spilanthes acmella Murr. *Industrial Crops and Products*, *36*(1), 321-328.

Soloway, Saul, y SAMUEL H Wilen. 1952. "Improved Ferric Chloride Test for Phenols." *Analytical Chemistry* 24 (6): 979–983.

Srivastava, Toolika, Sandip Das, Sudhir Kumar Sopory, y P S Srivastava. 2009. "A Reliable Protocol for Transformation of Catharanthus Roseus through Agrobacterium Tumefaciens." *Physiology and Molecular Biology of Plants* 15 (1): 93–98.

Tekoah, Yoram, Avidor Shulman, Tali Kizhner, Ilya Ruderfer, Liat Fux, Yakir Nataf, Daniel Bartfeld, *et al*. 2015. "Large-Scale Production of Pharmaceutical Proteins in Plant Cell

Culture—the Protalix Experience.” *Plant Biotechnology Journal* 13 (8): 1199–1208.

Torres, Emy Shilena, Javier Torres, Claudia Moreno, and Rafael Arango. 2012. “Development of Transgenic Lines from a Male-Sterile Potato Variety, with Potential Resistance to Tecia Solanivora Povolny.” *Agronomía Colombiana* 30 (2):163–171.

Wickremesinhe, Enaksha R M, y Richard N Arteca. 1994. “Taxus Cell Suspension Cultures: Optimizing Growth and Production of Taxol.” *Journal of Plant Physiology* 144 (2): 183–188.

Wirth, Sonia, Gabriela Calamante, Alejandro Mentaberry, Leonardo Bussmann, Mariano Lattanzi, Lino Barañao, y Fernando Bravo-Almonacid. 2004. “Expression of Active Human Epidermal Growth Factor (HEGF) in Tobacco Plants by Integrative and Non-Integrative Systems.” *Molecular Breeding* 13 (1): 23–35.

Xu, Jianfeng, y Ningning Zhang. 2014. “On the Way to Commercializing Plant Cell Culture Platform for Biopharmaceuticals: Present Status and Prospect.” *Pharmaceutical Bioprocessing* 2 (6): 499.