



5º CONGRESO FORESTAL
ESPAÑOL

5º Congreso Forestal Español

Montes y sociedad: Saber qué hacer.

REF.: 5CFE01-259

Editores: S.E.C.F. - Junta de Castilla y León
Ávila, 21 a 25 de septiembre de 2009
ISBN: 978-84-936854-6-1
© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Efecto de las características del biorreactor y de su manejo sobre el desarrollo de cultivos embriogénicos de alcornoque.

JIMENEZ, J.¹; ALONSO BLÁZQUEZ, N.²; HERNÁNDEZ, I.²; CARNEROS, E.²; CUENCA, B.³; OCAÑA, L.⁴; RUIZ, M.²; CELESTINO, C.²; TORIBIO, M.²; ALEGRE J.²

¹ INIA. Ctra. De la Coruña km 7,5 28040 Madrid.

² IMIDRA. Finca El Encín. Apdo. 127 28800 Alcalá de Henares (Madrid)

³TRAGSA. Dep. de Mejora Agroforestal. Crta. Maceda-Valdrey km 2 32708 Maceda (Ourense)

⁴TRAGSA. Subdirección de I + D + i. Julián Camarillo, 6b. 28037 Madrid

E-mail: jesus.alegre@madrid.org

Resumen

En el marco del proyecto SEFEAL-2, liderado por TRAGSA, se aplican protocolos de embriogénesis somática (ES) para desarrollar variedades de alcornoque de alta calidad y productividad. Al mismo tiempo se mejora la técnica de ES para abaratar los costes y permitir su aplicación a escala comercial. En el alcornoque, como en otras especies, el desarrollo comercial de la embriogénesis como técnica de multiplicación masiva se basa en el uso de biorreactores y medios líquidos agitados. El diseño del biorreactor, su sistema de cierre y el nivel de agitación determinan el grado de mezclado, el estrés hidrodinámico y el intercambio gaseoso, y por ello afectan tanto al crecimiento como al desarrollo de los cultivos embriogénicos. Mediante un ensayo factorial se testaron 3 tipos de envase y tres niveles de agitación. Los efectos sobre el intercambio gaseoso se estimaron a través de la tasa de transferencia de O₂ (OTR) y su coeficiente volumétrico de transferencia de masa (K_{La}), y los efectos sobre el nivel de mezclado mediante el “shear force index” (SFI), un indicador de estrés hidrodinámico. El tipo de envase afectó básicamente al número total de agregados embriogénicos y a la frecuencia de formación de los agregados de mayor tamaño. El nivel de agitación tuvo mayores efectos que el tipo de envase tanto sobre el número como sobre el tamaño de los agregados. Para las condiciones ensayadas, que dieron lugar a valores de K_{La} comprendidos entre 0,11 h⁻¹ y 1,47 h⁻¹, la disponibilidad de oxígeno no pareció limitante. En cualquier caso, los efectos del tipo de envase y del nivel de agitación sobre los procesos de crecimiento y desarrollo de los materiales embriogénicos de alcornoque fueron complejos resultando muy significativa la interacción tipo de envase por nivel de agitación.

Palabras clave

Quercus suber L., biotecnología forestal, embriogénesis somática, medio líquido

1. Introducción

Disponemos de la tecnología necesaria para clonar árboles adultos de alcornoque mediante embriogénesis somática (Hernández et al. 2003 a y b) lo que nos ha permitido desarrollar un programa de clonación de genotipos sobresalientes e iniciar con ellos un proceso de evaluación en campo. En su estado de desarrollo actual, la ES en alcornoque permite la clonación de prácticamente cualquier individuo, pero no la producción en masa de material a bajo coste. La utilización del protocolo actual con fines comerciales, como todos los protocolos de embriogénesis que se desarrollan en medios gelificados, presenta

limitaciones cuando lo que se persigue es la producción masiva de material vegetal. Una alternativa para mejorar los rendimientos de la ES y de numerosas aplicaciones bioindustriales, es la utilización de biorreactores y medios líquidos agitados (Ziv, 2000; Büchs J., 2001; Lotter y Büchs 2004). Con el uso de medios líquidos se obtienen cultivos que se pueden fraccionar fácilmente en partículas de diferentes tamaños, empleando mallas calibradas. De esta forma se facilita el manejo, se ayuda a sincronizar el desarrollo y se reducen las necesidades de mano de obra.

Sin embargo cuando un cultivo se desarrolla sumergido en un medio líquido el intercambio gaseoso se ve muy limitado, porque la capacidad de difusión de los gases en una solución acuosa es muy pequeña. Con la agitación se favorece la difusión de los gases en la fase líquida, y por tanto se aumenta la disponibilidad de O₂, que es un sustrato básico para el crecimiento. Pero además la agitación suele ser necesaria para reducir la tendencia de las células y tejidos vegetales a la agregación y por otra parte hace que el inóculo, los nutrientes y los productos del metabolismo se distribuyan de forma uniforme en la fase líquida. Por último con la agitación, se eleva el nivel de mezclado y se consiguen mayores tasas de transferencia tanto del oxígeno, como del resto de los nutrientes (Sajc et al., 2000) pero también se pueden generar efectos negativos relacionados con la acción de las fuerzas hidrodinámicas sobre la forma de las células y su función (estrés hidrodinámico). Por todo ello el tipo de envase y su manejo tienen una notable influencia en los procesos de crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales cultivados *in vitro* (Buddendorf-Joosten & Woltering, 1994; Duetz y Witholt, 2004; Jeong 2006).

2. Objetivos

El objetivo de este trabajo fue medir en matraces Erlenmeyer los efectos de las características del envase y el nivel de agitación sobre la ventilación, el estrés hidrodinámico, las tasas de multiplicación (número de agregados celulares) y las características morfológicas de materiales embriogénicos de alcornoque.

3. Metodología

1 Material vegetal y condiciones de cultivo

Los cultivos embriogénicos de alcornoque en medio semisólido proliferan formando acúmulos de embriones. En medio líquido es posible cultivar suspensiones formadas por agregados celulares con capacidad embriogénica. Estas suspensiones se obtienen a partir de los acúmulos de embriones generados en el medio semisólido, tras su incubación en medio líquido con agitación.

Para realizar el presente trabajo se empleó material de un solo genotipo, el ALM80, uno de los alcornocales plus de la Almoraima, en el Parque de los Alcornocales de Cadiz. Este material se había mantenido previamente en medio líquido durante un periodo de dieciocho meses. Los tratamientos experimentales se iniciaron inoculando en los envases de cultivo cuatro agregados celulares de tamaño comprendido entre 800 y 1200 μm sobre 70 ml de medio, con una densidad de inoculación próxima a 2-3 mg de peso fresco por litro de medio. El medio de cultivo empleado contenía los macronutrientes de Schenk y Hildebrandt (1972), los micronutrientes, las vitaminas y el Fe-EDTA de Murashige y Skoog (1962) y una concentración de sacarosa de 30 g l⁻¹. Su pH se ajustó a 5,75 y se autoclavó a 121 °C durante 30 min. En adelante, en el texto, este medio se denomina con las siglas LSH.



2 Diseño de los ensayos

Mediante un diseño factorial completo se testaron los efectos de tres tipos de envase en combinación con tres niveles de agitación. Los envases utilizados fueron: Erlenmeyer liso de 100 ml (EL₁₀₀), Erlenmeyer liso de 250 ml (EL₂₅₀) y Erlenmeyer con escotaduras de 150 ml (EE₁₅₀), y los niveles de agitación: 60 rpm, 110 rpm y 160 rpm. Para cerrar los envases se utilizó una lámina doble de papel de aluminio. Para cada combinación de los factores “tipo de envase × nivel de agitación” se establecieron 4 repeticiones. Los cultivos, en todos los casos se mantuvieron en agitación continua, sobre agitadores orbitales horizontales de 2,5 cm de radio de giro, a temperatura constante de 25° C y con fotoperiodo de 16 horas de luz.

3 Medidas realizadas

Para caracterizar las condiciones en que se desarrollaron los cultivos se determinaron previamente el nivel de ventilación y el grado de mezclado en cada tratamiento. Para determinar el nivel de ventilación se midieron la tasa de transferencia de oxígeno (OTR) y el coeficiente de transferencia de masa (K_{La}). Para estimar el nivel de mezclado se midió el Shear Force Index (SFI), un indicador del estrés hidrodinámico. Las proliferaciones obtenidas se evaluaron al finalizar las 6 semanas del periodo de cultivo determinándose el número total de agregados, su distribución en clases de tamaño, y la morfología de los agregados de mayor tamaño. Para caracterizar la evolución del medio de cultivo, a las seis semanas, se determinaron el pH, la conductividad eléctrica (CE) y el porcentaje de oxígeno disuelto (OD).

Determinación del K_{La} y la OTR.

El K_{La} se determinó según la metodología descrita por la APHA (1980) consistente en desplazar el oxígeno del líquido dejando después que en contacto con la atmósfera circundante y por difusión a favor de gradiente, se alcance de nuevo el nivel de equilibrio y por tanto la saturación de oxígeno. Para desplazar el oxígeno del medio se emplearon concentraciones en exceso de Na_2SO_3 (0.15 y 0.25 mM) catalizando la oxidación del sulfito de sodio con CuSO_4 . Las determinaciones se realizaron a 25° C en las condiciones de operación establecidas para los ensayos de cultivo. Para cada tratamiento se realizaron entre 20 y 30 determinaciones, por duplicado, a intervalos regulares de tiempo. El oxígeno disuelto se determinó con un oxímetro polarográfico (Cole Parmer 05945-55).

La dinámica del proceso se puede describir mediante una ecuación del tipo:

$$\ln (C^*-C_0)/(C_1- C_0) = Kt$$

Donde:

C_1 (mg l⁻¹) es la concentración de oxígeno en la fase líquida en el tiempo 1

C^* (mg l⁻¹) es la concentración de oxígeno en la fase líquida cuando se alcanza el equilibrio

C_0 (mg l⁻¹) es la concentración de oxígeno en la fase líquida en el tiempo 0

t es la unidad de tiempo (generalmente horas o minutos)

K (h⁻¹ o min⁻¹) representa el coeficiente de transferencia del sistema.

El valor de K_{La} se determina mediante regresión lineal, siendo la pendiente de la ecuación que se obtiene cuando los valores de K se representan en función del tiempo.

La tasa de transferencia de oxígeno (OTR) se estimó contabilizando el tiempo transcurrido desde que el sulfito de sodio, utilizado en exceso, se oxidó completamente, y por tanto comenzó a disolverse oxígeno en el medio, hasta que se alcanzó el nivel de saturación. La OTR se cálculo como el cociente entre la concentración de oxígeno a saturación y el tiempo necesario para alcanzarla.



Estrés hidrodinámico

El SFI se determinó según la metodología de Tanaka (1981), con las modificaciones propuestas por Huang et al. (2006). En cada tratamiento se emplearon 175 mg de β -naphthol suspendidos en 70 ml de medio LSH. Se usaron partículas de β -naphthol con un tamaño medio de 1.2 μm y una superficie media de 6 mm^2 . La concentración de β -naphthol en la disolución se determinó en espectrofotómetro, a una longitud de onda de 275 nm. En cada tratamiento primero se determinó la concentración máxima alcanzada por el β -naphthol y el tiempo necesario para alcanzarla. A partir de estas determinaciones se establecieron intervalos de medida a tiempos regulares, adecuados a la evolución de la concentración en cada tratamiento. Las curvas concentración-tiempo se construyeron con 20 medidas realizadas por triplicado, a temperatura ambiente (18-20° C).

Número de agregados

Al finalizar el periodo de cultivo las suspensiones se pasaron por una secuencia de tamices de 800, 180 y 40 μm separando las proliferaciones obtenidas en tres rangos de tamaño: la fracción mayor de 800 μm (agregados grandes), la comprendida entre 800–180 μm (agregados medianos) y la comprendida entre 180–40 μm (agregados pequeños). Estas fracciones se depositaron sobre placas Petri que contenían medio LSH y se fotografiaron. A partir de las imágenes obtenidas se realizó un recuento del número de estructuras. Los agregados grandes se evaluaron teniendo en cuenta además de su número, su morfología.

4. Resultados y discusión

En la tabla 1 se muestran los valores del coeficiente volumétrico de transferencia de masa para el oxígeno (K_{La}), la tasa de transferencia de oxígeno (OTR) y el índice de estrés hidrodinámico (SFI) obtenidos para cada tipo de envase en función del nivel de agitación. El menor nivel de ventilación correspondió a los envases EL₁₀₀ agitados a 60 rpm en los que se obtuvo una K_{La} de 0.11 h^{-1} y una OTR de 1,34 $\cdot 10^{-8}$ g O₂ envase⁻¹ sg⁻¹. El mayor nivel de ventilación se registró en los envases EE₁₅₀ agitados a 160 rpm, con una K_{La} de 1,47 h^{-1} y una OTR de 8,12 $\cdot 10^{-8}$ g O₂ envase⁻¹ sg⁻¹. La comparación de estos valores con otros datos publicados es compleja porque entre la mayoría de los estudios existen notables diferencias en las condiciones de operación.

Tabla 1. Efecto del tipo de envase y el nivel de agitación sobre el coeficiente volumétrico de transferencia de masa para el oxígeno (K_{La}), la tasa de transferencia (OTR) y el índice de estrés (SFI).

| Envase | Agitación rpm | K_{La} | EE | OTR | EE | SFI | EE |
|-------------------|------------------|-----------------|--------|---|--------|---------------------------------------|--------|
| | | h^{-1} | | $\times 10^{-8}$ g O ₂ flask ⁻¹ sg ⁻¹ | | $\times 10^3$ cm min ⁻¹ | |
| EL ₁₀₀ | 60 | 0.11 | ± 0.01 | 1.34 | ± 0.08 | 1.40 | ± 0.07 |
| | 110 | 0.67 | ± 0.03 | 4.64 | ± 0.14 | 4.00 | ± 0.23 |
| | 160 | 0.77 | ± 0.06 | 5.32 | ± 0.21 | 4.60 | ± 0.28 |
| EE ₁₅₀ | 60 | 0.29 | ± 0.01 | 1.92 | ± 0.04 | 2.30 | ± 0.13 |
| | 110 | 1.17 | ± 0.06 | 6.19 | ± 0.06 | 4.70 | ± 0.24 |
| | 160 | 1.47 | ± 0.06 | 8.12 | ± 0.05 | 8.80 | ± 0.63 |
| EL ₂₅₀ | 60 | 0.82 | ± 0.07 | 5.38 | ± 0.26 | 3.8 | ± 0.29 |
| | 110 | 1.26 | ± 0.06 | 6.50 | ± 0.11 | 7.4 | ± 0.34 |
| | 160 | 1.31 | ± 0.11 | 8.16 | ± 0.29 | 8.7 | ± 0.59 |

EL₁₀₀ = Erlenmeyer liso de 100 ml, EE₁₅₀ = Erlenmeyer con escotadura de 150 ml, EL₂₅₀ = Erlenmeyer liso de 250 ml.
EE = Error Estandar.

En cualquier caso las estimaciones de la K_{La} obtenidas para los envases lisos de mayor tamaño (EL₂₅₀) se encuentran en un rango de valores semejante a las estimaciones realizadas por Veglio et al. (1998) trabajando con Erlenmeyers de 300 ml, con diferentes sistemas de cierre y diferentes niveles de llenado.

El nivel de mezclado menor correspondió a los envases EL₁₀₀ a 60 rpm con un valor de SFI de $1,40 \cdot 10^3 \text{ cm min}^{-1}$ y el mayor a los envases EE₁₅₀ a 160 rpm con un valor de SFI de $8,80 \cdot 10^3 \text{ cm min}^{-1}$. Como cabía esperar en todos los envases la ventilación y el nivel de mezclado aumentaron con el nivel de agitación, sin embargo la dinámica del proceso fue diferente para cada tipo de envase. A 60 rpm las diferencias entre los envases fueron muy importantes con niveles de ventilación y mezclado menores en los envases de menor tamaño, que tenían menor diámetro y por tanto menor superficie de intercambio con la fase gaseosa y, para el mismo volumen de medio, mayor espesor en su lámina de líquido (Tabla 2). Con 60 rpm se obtuvieron valores de K_{La} de $0,11 \text{ h}^{-1}$, $0,29 \text{ h}^{-1}$ y $0,82 \text{ h}^{-1}$ y valores de SFI de $1,4 \text{ cm min}^{-1}$, $2,3 \text{ cm min}^{-1}$ y $3,8 \cdot 10^3 \text{ cm min}^{-1}$ para EF₁₀₀, BEF₁₅₀ y EF₂₅₀ respectivamente. A bajas revoluciones la presencia de escotaduras en los envases, tratamiento EE₁₅₀, parece tener poco efecto sobre las variables consideradas, que se ven más afectadas por las dimensiones del envase.

Tabla 2. Características físicas de los envases utilizados y su efecto sobre los parámetros que caracterizan la relación entre el componente líquido y el componente gaseoso del medio. (EL₁₀₀ = Erlenmeyer liso de 100 ml, EE₁₅₀ = Erlenmeyer con escotaduras de 150 ml, Erlenmeyer liso de 250 ml).

| | EL ₁₀₀ | EE ₁₅₀ | EL ₂₅₀ |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|
| Características del envase | | | |
| Capacidad nominal (ml) | 100 | 150 | 250 |
| Capacidad real (ml) | 127 | 193 | 318 |
| Diámetro del cuello (mm) | 22 | 28 | 35 |
| Diámetro de la base (mm) | 64 | 73 | 85 |
| Relaciones fase líquida/fase gaseosa | | | |
| Volumen de líquido (ml) | 70 | 70 | 70 |
| Volumen de gas (ml) | 57 | 123 | 248 |
| Espesor de la capa líquida (mm) | 31 | 27 | 21 |
| Área de transferencia, en reposo (cm ²) | 22 | 34 | 54 |
| Proporción área de transferencia/volumen de llenado | 0,32 | 0,49 | 0,77 |

Cuando se incrementó el nivel de agitación hasta 110 rpm la ventilación creció en todos los envases pero lo hizo proporcionalmente más en los envases de menor diámetro. En EL₁₀₀ la K_{La} se multiplicó por 6,1 en EE₁₅₀ por 4,0 y en EL₂₅₀ por 1,5. Sin embargo los efectos sobre el incremento relativo del nivel de mezclado fueron en todos los envases de un orden de magnitud muy semejante, en EL₁₀₀ el SFI se multiplicó por 2,9, mientras que en EE₁₅₀ se multiplicó por 1,9 y en EL₂₅₀ por 2,0.

Un nuevo incremento en el nivel de agitación hasta 160 rpm, modificó muy poco la ventilación y sólo moderadamente el nivel de mezclado en los dos envases lisos (EL₁₀₀ y EL₂₅₀). En EL₁₀₀ y EL₂₅₀ la K_{La} se multiplicó por 1,04 y el SFI por 1,2. Sin embargo con este nuevo incremento de la agitación la presencia de escotaduras si tuvo efectos más importantes y en los envases EE₁₅₀ la K_{La} se incrementó un 30 % (x 1,3) y el SFI se incrementó un 90 % (x 1,9).

La Tabla 3 muestra los resultados del análisis de varianza realizado para determinar los efectos del tipo de envase y el nivel de agitación sobre el desarrollo de las suspensiones embriogénicas de alcornoque. Para el conjunto de los tratamientos se obtuvo una media de 1.400 agregados, de los cuales 193 fueron grandes (> 800 μm), 244 medianos (180 – 800 μm)

y 963 pequeños (40 – 180 μm). El tipo de envase afectó al número total de estructuras y al número de agregados obtenido en cada rango de tamaño. Los envases con escotaduras (EE_{150}) dieron valores medios de proliferación mayores, con una media de 256 agregados grandes, 326 medianos y 1206 pequeños; frente a los 181, 181 y 743 obtenidos de media en EL_{100} y los 140, 224 y 941 obtenidos de media en EL_{250} . A nivel de proporciones el envase solo afectó de forma significativa a la proporción de agregados de mayor tamaño. Los envases EL_{250} dieron un 9,7 % de agregados grandes frente al 16,4 % y 14,7 % obtenidos en EL_{100} y EE_{150} respectivamente.

El número de estructuras aumentó con el nivel de agitación. A 60 rpm se obtuvieron 932 agregados, a 110 rpm 1051 y a 160 rpm 2217. La proporción de agregados grandes y medianos fue mayor a 110 y 160 rpm mientras que a 60 rpm se obtuvo una proporción de agregados pequeños (82,8 %) mayor que a 110 rpm (62,5 %) y a 160 rpm (67,0 %).

Tabla 3. Análisis de varianza de los efectos del tipo de envase y la velocidad de agitación sobre el número de agregados celulares de tamaño grande, mediano y pequeño, su frecuencia, y sobre el pH, la conductividad eléctrica y (CE) y el oxígeno disuelto (OD) al final de un periodo de cultivo de seis semanas. Valores medios del ANOVA y significación estadística de cada factor.

| Factor | Número de agregados | | | | Frecuencia (%) | | | pH | EC | OD |
|---------------------------|---------------------|--------|---------|---------|----------------|---------|---------|-------|-------|-------|
| | Total | Grande | Mediano | Pequeño | Grande | Mediano | Pequeño | | | |
| Tipo de envase | | | | | | | | | | |
| EL_{100} | 1105 | 181 | 181 | 743 | 16.4 | 14.0 | 69.6 | 5.4 | 2.9 | 56.6 |
| EE_{150} | 1789 | 256 | 326 | 1206 | 14.7 | 16.8 | 68.6 | 5.6 | 2.8 | 64.0 |
| EL_{250} | 1305 | 140 | 224 | 941 | 9.7 | 16.1 | 74.2 | 5.9 | 2.7 | 66.4 |
| Agitación (rpm) | | | | | | | | | | |
| 60 | 932 | 103 | 73 | 756 | 10.5 | 6.7 | 82.8 | 5.3 | 3.0 | 64.7 |
| 110 | 1051 | 177 | 218 | 655 | 17.1 | 20.4 | 62.5 | 5.9 | 2.6 | 60.6 |
| 160 | 2217 | 299 | 439 | 1479 | 13.2 | 19.8 | 67.0 | 5.8 | 2.8 | 61.7 |
| Media General | 1400 | 193 | 244 | 963 | 13.6 | 15.6 | 70.8 | 5.7 | 2.8 | 62.3 |
| Significación del factor | | | | | | | | | | |
| Envase | 0.000 | 0.015 | 0.011 | 0.000 | 0.010 | 0.524 | 0.342 | 0.002 | 0.051 | 0.004 |
| Agitación | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.010 | 0.000 | 0.000 | 0.001 | 0.000 | 0.282 |
| Envase \times Agitación | 0.006 | 0.146 | 0.080 | 0.001 | 0.034 | 0.349 | 0.434 | 0.572 | 0.170 | 0.507 |

EL_{100} = Erlenmeyer liso de 100 ml, EE_{150} = Erlenmeyer con escotaduras de 150 ml, Erlenmeyer liso de 250 ml. Agregados de tamaño grande (> 800 μm), de tamaño medio (800 – 180 μm), de tamaño pequeño (180 - 40 μm)

Se produjeron interacciones significativas entre el nivel de agitación y el tipo de envase. Las interacciones afectaron tanto al número total de agregados como a la proporción de agregados en la clase de mayor tamaño (Tabla 3). En los envases con escotaduras el número total de agregados creció con el nivel de agitación cuando se pasó de 60 a 110 rpm, y también cuando se pasó de 110 a 160 rpm. Sin embargo en los envases lisos EL_{100} las tasas de multiplicación solo crecieron de forma significativa al pasar de 110 a 160 y en los envases lisos EL_{250} las tasas de multiplicación disminuyeron al pasar de 60 a 110 rpm, para luego aumentar cuando se pasó de 110 a 160 rpm (Figura 1).

La evolución del número de agregados de tamaño grande con el nivel de agitación fue diferente a la observada para el número total de agregados. Para los envases EL₁₀₀ y EE₁₅₀ el número de agregados grandes creció de forma continua con el nivel de agitación, siguiendo los envases con escotaduras y los envases lisos de 100 ml para esta variable un patrón semejante y diferente del observado para los envases EL₂₅₀ (Figura 2)

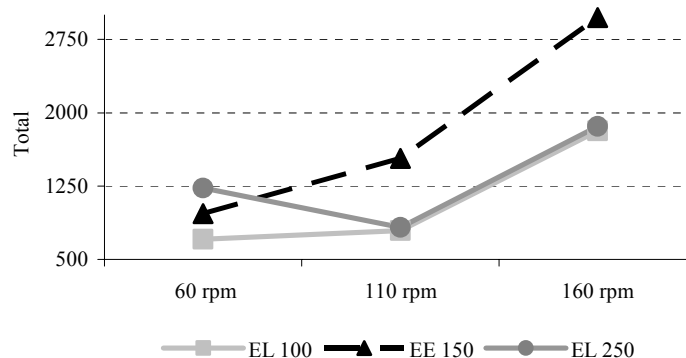


Figura 1. Representación de las interacciones entre el tipo de envase y el nivel de agitación para el número total de estructuras que se desarrolló en cada tratamiento al cabo de las seis semanas de cultivo. EL₁₀₀ = Erlenmeyer liso de 100 ml, EE₁₅₀ = Erlenmeyer con escotaduras de 150 ml, Erlenmeyer liso de 250 ml.

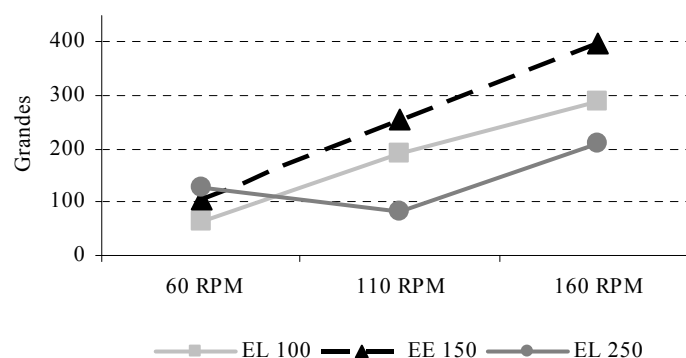


Figura 2. Representación de las interacciones entre el tipo de envase y el nivel de agitación para el número total de agregados grandes que se desarrolló en cada tratamiento al cabo de las seis semanas de cultivo. EL₁₀₀ = Erlenmeyer liso de 100 ml, EE₁₅₀ = Erlenmeyer con escotaduras de 150 ml, Erlenmeyer liso de 250 ml.

Los valores finales de pH y CE de los medios de cultivo variaron significativamente con el tipo de envase y el nivel de agitación. A lo largo del periodo de cultivo el pH del medio aumentó al tiempo que disminuyó la CE. La CE del medio depende de la concentración de sales minerales, y en particular de la concentración de N, por lo que es habitual un descenso de la conductividad asociado al crecimiento del cultivo. De hecho la CE se ha empleado como medida indirecta del crecimiento en suspensiones de células vegetales (Ryu et al., 1990). Por otra parte en medios como el empleado, en los que la forma dominante de nitrógeno son las sales nítricas, es habitual que el pH se incremente a lo largo del cultivo a consecuencia del metabolismo del nitrato (Durzan, 1987; Niedz, 1994). Las diferencias observadas entre los tratamientos al final del periodo de cultivo son difíciles de interpretar porque sin duda están asociadas a diferencias de crecimiento pero también son reflejo de diferencias a nivel metabólico como consecuencia de fenómenos de estrés y de diferencias en la disponibilidad de oxígeno que se sabe que afectan al pH del medio (Paek et al., 2001).

También las relaciones del tipo de envase y su manejo con las tasas de multiplicación son complejas. Como lo son sus relaciones con el nivel de ventilación, el grado de mezclado y el estrés hidrodinámico. Si se consideran globalmente los tratamientos ensayados se observa una relación positiva de la tasa de multiplicación con el nivel de agitación y la ventilación, pero no es fácil separar los efectos atribuibles a estos factores porque las características del envase y las prácticas de manejo que hacen crecer la ventilación también incrementan la agitación y esto hace que ambas variables no sean realmente independientes (Kieran et al., 1997). De hecho se ha descrito la existencia de una relación de tipo lineal entre el nivel de ventilación y la intensidad del estrés hidrodinámico incluso para biorreactores con diseños muy diferentes (Tanaka, 1981). Los coeficientes de correlación obtenidos para la tasa de multiplicación con la K_{La} y el SFI fueron relativamente altos y de un orden de magnitud muy semejante ($R = 0.62$ y $R = 0.63$, respectivamente) pero no parecen haber tenido el mismo nivel de influencia en los resultados observados. La consecuencia básica de un incremento en la ventilación es que permite incrementar la disponibilidad de O_2 . Los envases y manejos ensayados produjeron importantes diferencias para la disponibilidad de oxígeno (Tabla 1) pero estas diferencias no se tradujeron en incrementos, cuantitativamente importantes, en la cantidad de OD. De hecho al final del periodo de cultivo el OD se mantenía en todos los tratamientos en niveles comprendidos entre 55 % y el 69 % valores que indican, según la información publicada, que la disponibilidad de oxígeno no debió resultar limitante en ningún caso, de forma que los efectos observados en las tasas de multiplicación parecen guardar más relación con los fenómenos de transferencia de masa y estrés hidrodinámico asociados al nivel de agitación.

En todos los tratamientos la fracción formada por agregados grandes contuvo materiales de morfologías muy heterogéneas, desde embriones individuales en diferentes estados de desarrollo hasta agregados de células embriogénicas de diferentes formas y texturas. La frecuencia de aparición de embriones con morfologías semejantes a la de los embriones cigóticos, aunque fue baja en todos los casos, fue mayor en aquellos tratamientos que tuvieron menores niveles de agitación y bajos índices SFI.

5. Conclusiones

El tipo de envase y su manejo condicionan el crecimiento y el desarrollo de los agregados embriogénicos de alcornoque. Para las condiciones de trabajo ensayadas la disponibilidad de oxígeno no aparece como un factor limitante, y sin embargo tanto las tasas de multiplicación como los fenómenos de desarrollo aparecen claramente vinculados a fenómenos de transferencia de masa y estrés hidrodinámico. Las interacciones entre el nivel de agitación y las características del envase tienen una gran importancia en el desarrollo de sistemas de cultivo en fases que hagan más eficiente la tecnología de producción clonal de variedades de alcornoque.

6. Agradecimientos

Nuestro agradecimiento a Esther López, Alfredo Cuevas y Noelia Ramírez por su asistencia técnica. Este trabajo se ha financiado con fondos del Plan Nacional I+D+I (2004-2007) del MEC a través del Proyecto PROFIT CIT-010000-2007-5

7. Bibliografía

APHA. 1980. Standard methods for the examination of water and wastewater. Fifteenth edition. American Public Health Association. Washington, DC. 1134 pp

BUDDENDORF-JOOSTEN, J.M.C.; WOLTERING, E.J.; 1994. Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development in vitro. *Plant Growth Reg.* 15:1–16

BÜCHS J. 2001. Introduction to advantages and problems of shaken cultures *Biochemical Engineering Journal* 7: 91–98

DUETZ, W.A.; WITHOLT, B. 2004. Oxygen transfer by orbital shaking of square vessels and deepwell microtiter plates of various dimensions. *Biochemical Engineering Journal* 17 181–185

DURZAN, D.J. 1987. Ammonia: Its analogues, metabolic products and site of action in somatic embryogenesis. In: Cell and Tissue Culture in Forestry, 2nd Edition, J.M. Bonga and D.J. Durzan (eds.). Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk, Volume 2, Principles and Methods: Growth and Development. 92-136.

HUANG, S.Y.; CHAN, H.S.; WANG, T.T. 2006. Induction of somatic embryos of celery by control of gaseous compositions and other physical conditions. *Plant Growth Regul.* 49:219–227

HERNÁNDEZ, I.; CELESTINO, C.; TORIBIO, M. 2003 (a). Vegetative propagación of *Quercus suber* L. by somatic embryogenesis. I. Factors affecting the induction in leaves from cork oak trees. *Plant Cell Rep* 21:759-764

HERNÁNDEZ, I.; CELESTINO, C.; ALEGRE J.; TORIBIO, M. 2003 (b). Vegetative propagación of *Quercus suber* L. by somatic embryogenesis. II. Plant regeneration from selected cork oak trees *Plant Cell Rep* 21:765-770

JEONG, C.S.; CHAKRABARTY, D.; HAHN, E.J.; LEE, H.L.; PAEK, K.Y. 2006. Effects of oxygen, carbon dioxide and ethylene on growth and bioactive compound production in bioreactor culture of ginseng adventitious roots. *Biochemical Engineering Journal* 27: 252–263

KIERAN, P.M.; MACLOUGHLIN, P.F.; MALONE, D.M. 1997. Plant cell suspension cultures: some engineering considerations *Journal of Biotechnology* 59 (1997) 39–52

LOTTER, S.; BÜCHS, J. 2004 Utilization of specific power input measurements for optimization of culture conditions in shaking flasks. *Biochemical Engineering Journal* 17: 195–203

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497

NIEDZ, R.P. 1994 Growth of embryogenic sweet orange callus on media varying in the ratio of nitrate to ammonium nitrogen. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 39 (1): 1-5



- PAEK, K.Y.; HANN, E.J.; SON, S.H. 2001. Application of bioreactors for large-scale micropropagation systems of plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37:149-157
- RYU, D.D.Y.; LEE, S.O.; ROMANI, R.J. 1990. Determination of growth rate for plant cell cultures: Comparative studies. *Biotechnology and Bioengineering* 35: 305-311
- SAJC, L.; GRUBISIC, D.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. 2000 Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research *Biochemical Engineering Journal* 4: 89–99
- SCHENK, R.U.; HILDEBRANDT, A.C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50:199-204
- TANAKA, H. 1981. Technological problems in cultivation of plant cells at high density. *Biotechnology and Bioengineering* 23: 1203-1218
- VEGLIO, F.; BEOLCHINI, F.; UBALDINI, S. 1998. Empirical models for oxygen mass transfer, a comparison between shake flask and lab-scale fermentor and application to manganiferous ore bioleaching. *Process Biochemistry* 33(4): 367-376
- ZIV M. 2000 Bioreactor technology for plant micropropagation. *Horticultural Reviews* 24: 1-30

