

Factores que afectan al crecimiento en cultivos de *N. benthamiana* en matraz

Factors affecting growth in flasks liquid cultures of *N. benthamiana*

F. Verdú-Navarro^{1,2*}, J. Weiss¹, J.A. Moreno-Cid², M. Egea-Cortines¹

¹Grupo de Genética y Biología Vegetal. Departamento Ingeniería Agronómica. Universidad Politécnica de Cartagena. Pº Alfonso XIII, 48, 30203, Cartagena, Murcia, España.

²Bionet S.L. Av. Azul, Parque Tecnológico Fuente Álamo, 30320, Fuente Álamo, Murcia, España.

*fuensanta.verdun@edu.upct.es

Resumen

A la hora de realizar cultivos in vitro vegetales, hay que tener en cuenta diversos factores que pueden afectar a su crecimiento, como pueden ser: medio de cultivo, temperatura, luz, etc. Estos factores afectarán de forma diferente a cada tipo de cultivo, especialmente a diferentes especies vegetales. En este ensayo, se ha caracterizado cómo afectan la luz, el tamaño del inóculo y la disgregación del inóculo al crecimiento de cultivos en matraces de *Nicotiana benthamiana*. El factor que más influye en el crecimiento de este tipo de cultivo es el tamaño del inóculo: se requiere un mínimo porcentaje de inóculo para que el crecimiento del cultivo sea significativo.

Palabras clave: densidad celular; luz; disgregación; cultivo en matraz; callos.

Abstract

In vegetal in vitro cultures, there are several factors to be considered that can affect growth, such as: culture medium, temperature, light, etc. These factors affect differently each type of culture, specially to different species. In this assay, we have studied how the light, the size of the inoculum and the inoculum disaggregation affect the growth of flasks cultures of *Nicotiana benthamiana*. The most influent factor is the inoculum size: it is necessary to have a minimum inoculum to achieve a significant growth.

Keywords: cell density; light; disaggregation; flasks culture; calli.

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo in vitro de especies vegetales es una herramienta de mucha importancia dentro del ámbito tanto de la investigación como de la industria y producción. Por ello se lleva realizando desde hace décadas y hay muchos estudios para su optimización para cada especie vegetal. Dentro de esta optimización, hay diversos factores que se pueden alterar o cambiar. También hay que tener en cuenta el tipo de cultivo que se va a realizar.

Dentro del cultivo in vitro se puede destacar el cultivo de células indiferenciadas en medio líquido ya que presenta numerosas ventajas a la hora de producir metabolitos, proteínas u otros compuestos de interés industrial con respecto al empleo de plantas completas (1,2).

En esta línea de investigación se busca la optimización del cultivo de células en medio líquido de la especie *Nicotiana benthamiana*. Primero en matraz, para luego escalar el proceso a biorreactores. En estos ensayos en concreto se va a observar el efecto que produce la presencia o ausencia de luz, el tamaño del inóculo y el método de disgregación del callo a la hora de inocular los matraces.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

Como planta modelo para el estudio se empleó la especie vegetal *Nicotiana benthamiana*. Todo el material vegetal, incluidas semillas, plántulas y callos, pertenecen al grupo de Genética y Biología Molecular del Instituto de Biotecnología Vegetal de la Universidad Politécnica de Cartagena. Las composiciones de los medios de cultivo para la inducción y mantenimiento de callo, así como para el cultivo en medio líquido, aparecen en la Tabla 1.

2.2 Métodos

Para la inducir la producción de callo se cortan hojas de las plántulas y se cultivan en placas con el medio específico para la formación de callo. En el caso del cultivo celular en medio líquido, el procedimiento para su inicio consiste en extraer porciones de callo friables, disgregarlas e introducir las en los matraces con el medio de cultivo determinado.

Las condiciones de cultivo establecidas son termoperíodo 25/18°C y fotoperíodo 16/8 horas luz/oscuridad. Los matraces se incuban con agitador orbital a 150 rpm durante un periodo de 14 días. En los ensayos para observar el efecto de la presencia o ausencia de luz, los matraces con la condición de oscuridad se tapan con papel de aluminio completamente.

Para analizar el crecimiento de los cultivos en los matraces, se emplea el método de peso húmedo (*Wet Cell Weight*). Se filtra el contenido de cada matraz usando un filtro de hemicelulosa tarado y se pesa la biomasa final.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar, en la Fig. 1 se puede observar la diferencia de peso entre el inicio (peso del inóculo) y el final del cultivo de matraces empleando dos métodos diferentes de disgregación del callo: en Eppendorf con vórtex o con espátula de forma directa dentro del matraz. Existe una gran diferencia en el crecimiento de los matraces empleando un método u otro ($p < 0,05$), siendo la disgregación directa la mejor opción.

Posteriormente, los resultados del crecimiento de los matraces de los ensayos sobre efecto de la presencia o ausencia de luz se presentan en la Fig. 2. Aunque el crecimiento en presencia de luz sea levemente mayor, la diferencia es muy poco notable. Según el análisis estadístico ANOVA $p < 0,05$, pero el valor es muy cercano.

Por último, los resultados del último ensayo, evaluando el efecto que producen diferentes tamaños de inóculo, se pueden observar en la Fig. 3. Hay tres grupos diferentes de tamaños de inóculo: entre 1-3%; entre 3,5-5% y entre 10-15%, todos en peso/volumen. Se puede apreciar una clara evidencia de que, a mayor tamaño de inóculo, el crecimiento del cultivo es mayor. En los matraces con bajo porcentaje de inóculo, el crecimiento es casi imperceptible: tras dos semanas de cultivo la biomasa se mantiene casi igual que al inicio. Sin embargo, cuando el porcentaje de inóculo supera el 10%, sí que se observa un aumento apreciable en la biomasa total.

4. CONCLUSIONES

Tras analizar los resultados obtenidos en los experimentos, se puede concluir que los cultivos crecen mejor cuando se emplea el método de disgregación directa con espátula y que el tamaño de inóculo mínimo para poder observar un crecimiento notable es del 10% peso/volumen. Sin embargo, la luz no es un factor tan determinante en la producción de biomasa de esta especie vegetal.

El que exista un tamaño mínimo de inóculo puede deberse a que exista algún tipo de señalización que dependa de la densidad celular y que active o inhiba el crecimiento celular a determinadas densidades del cultivo. Para verificar esta hipótesis, en próximos ensayos se realizarán análisis transcriptómicos en búsqueda de estas señales.

5. AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido posible gracias a la financiación de la empresa BIONET S.L. y la ayuda DIN2020-011559 financiada por MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033. También agradecer al departamento de Genética y Biología Molecular de la Universidad de Cartagena por aportar los materiales necesarios para realizar los ensayos.

6. REFERENCIAS

1. Hellwig S, Drossard J, Twyman R, Fischer R. Plant cell cultures for the production of recombinant proteins. *Nat biotechnol.* 2004;22(11):1415-22.
2. Santos RB, Abranches R, Fischer R, Sack M, Holland T. Putting the Spotlight Back on Plant Suspension Cultures. *Front Plant Sci.* 2016. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2016.00297/full>

Tabla 1. Composición medio de cultivo para el material vegetal de *N. benthamiana*.

Compuesto	Inducción y mantenimiento callo	Medio líquido
	Concentración (g/L)	
Sacarosa	30	30
Murashige & Skoog basal	4,3	4,3
Myo-Inositol	0,1	0,1
KH ₂ PO ₄	0,204	0,204
Ácido nicotínico	0,5*	10*
Piridoxina	0,5*	5*
Tiamina	0,5*	10*
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	0,4*	2*
Kinetina	0,1*	0,1*
Phytagar	7,5	-

*Concentraciones en mg/L.

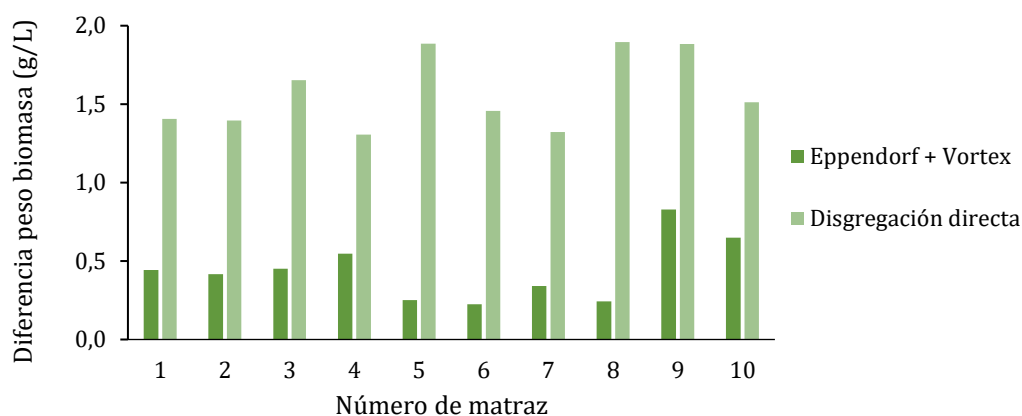


Figura 1. Diferencia de peso entre la biomasa inicial y final tras 14 días de cultivo usando métodos diferentes de disgregación.

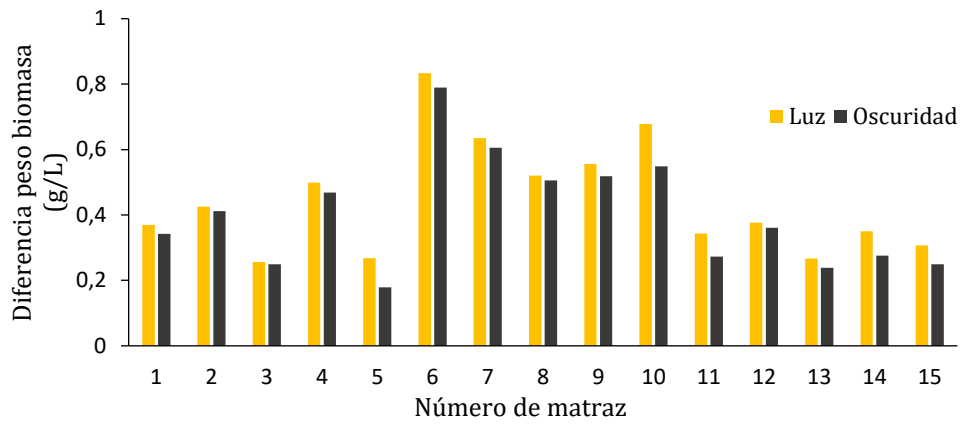


Figura 2. Diferencia de peso entre la biomasa inicial y final tras 14 días de cultivo bajo condiciones de luz y oscuridad.

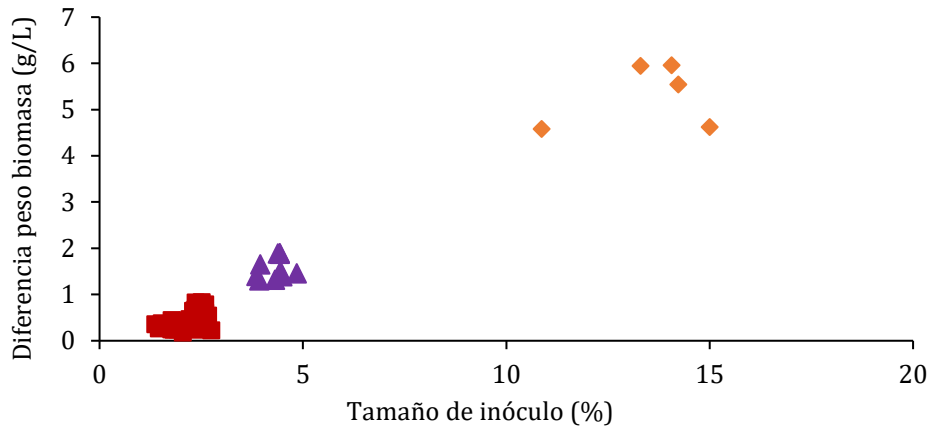


Figura 3. Diferencia de peso entre la biomasa inicial y final tras 14 días de cultivo empleando diferentes tamaños de inóculo. Las figuras rojas corresponden con valores de inóculo de entre el 1-3%, las moradas con valores comprendidos entre 3,5-5% y las naranjas a valores entre 10-15%.