CULTIVOS FOTOAUTOTRÓFICOS DE CÉLULAS VEGETALES EN SUSPENSIÓN. ESTABLECIMIENTO Y PERSPECTIVAS DE APLICACIÓN

PLANT CELL PHOTOAUTOTROPHIC SUSPENSION CULTURES. ESTABLISHMENT AND APPLICATION PERSPECTIVES

Luisa M. Gómez-Torres[1], Blanca Moreno-Gómez[1], Mario E. Velásquez-Lozano[1], César Aguirre-Mancilla[1] y Gerardo A. Aguado-Santacruz[2*]

[1]Departamento de Ingeniería Química y Ambiental, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Colombia. Avenida Carrera 30 No. 45-03, Bogotá, Colombia. Tel 57 (1) 3165000 Ext. 11006. [2]Centro Experimental Pecuario, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Km 6.5 Carr. Celaya-San Miguel de Allende, 38010, Celaya, Guanajuato, México. Tel 01 (461) 6115323. *Programa de Posgrado Instituto Tecnológico de Roque. Km 8 Carr. Celaya-Juventino Rosas, 38110, Celaya, Guanajuato, México. Tel 01(461) 6105600 Ext 133.

Autor para correspondencia (gaguado@inifap.gob.mx; gaguado.aguado@gmail.com)

RESUMEN

Debido a su naturaleza fotoautotrófica y capacidad para crecer en forma independiente como células aisladas, los cultivos celulares vegetales fotoautotróficos han aportado, desde su desarrollarlo, importante información sobre la fotosíntesis y la producción de metabolitos secundarios específicos. La diversidad de las dispirotas petrolíferas y la búsqueda de nuevas alternativas energéticas para hacer frente a esta situación, requiere la evaluación del potencial de estos sistemas para la producción de biocarburo o biodiesel, como sistemas independientes de fotosíntesis. En este artículo se revisan los cultivos celulares fotoautotróficos, el establecimiento de estos cultivos en escala, las estrategias empleadas para mejorar su crecimiento o cultivo, así referencia a los cultivos celulares de otras características que se han generado a la fecha, para establecer sus aplicaciones actuales y potenciales. De este análisis se concluye la necesidad de evaluar el potencial de estos cultivos como una alternativa para la producción de biocombustibles.

Palabras clave: *Cultivos celulares fotoautotróficos, suspensiones celulares, biocombustibles, biofotoreactores, cultivo bacterias.*

SUMMARY

Because of their photoautotrophic nature and ability to grow independently as isolated cells, photoautotrophic plant cell cultures have contributed, since their discovery, with important information about photosynthesis and the production of specific secondary metabolites. The reduction of oil deposits and the search for new energy sources to face this situation requires evaluating the potential of these photosynthetic systems for producing biofuel and biorfuel as alternative systems to petroleum. In this analytical review about the photoautotrophic plant cell cultures, the essential characteristics and the strategies employed for improving their growth in vitro are described making reference to the photoautotrophic cell systems obtained up to now and also establishing their actual and potential applications. From this analysis, it is evident the necessity of evaluating these cell cultures as alternative models for biofuel production.

Index words: *Photoautotrophic cell cultures, cell suspensions, biofuels, photobioreactors, cyanobacteria.*

Recibido: 24 de Febrero del 2013
Aceptado: 27 de Marzo del 2014

INTRODUCCIÓN

Los cultivos celulares representan un tipo especial del cultivo *in vitro* de organismos en el cual las células crecen en forma aislada e independiente. Estos sistemas permiten el análisis controlado de procesos genéticos, fisiológicos y bioquímicos que operan en plantas superiores a nivel celular (Lerner, 1985; Ziegler y Schulze, 1989; Wilhelm, 1992; Harrop *et al.*, 2013). Los cultivos de suspensiones celulares han demostrado ser sistemas experimentales valiosos para analizar diferentes aspectos de respuestas de defensa, transporte de iones, producción de metabolitos secundarios, regulación genética y transducción de señales (Ebel y Mithofer, 1998). Debido a que están conformadas de poblaciones uniformes de células que pueden ser cresidas en condiciones controladas, estos sistemas pueden ser utilizados para el establecimiento de procesos confiables y reproducibles a nivel de biorreactor.

Con base en sistemas de células aisladas se han realizado diversos estudios relacionados con los procesos fisiológicos, moleculares y bioquímicos que operan durante el estrés salino, osmótico y frío (Prasad *et al.*, 1994; Bhaskaran *et al.*, 1995; Tholakalavat *et al.*, 1994; Leonardi *et al.*, 1995; Robertson *et al.*, 1995; Hawkins y Lyne, 1997; Tholakalavat *et al.*, 1997; Cantel *et al.*, 1998) y han permitido el aislamiento de genes relacionados con estrés osmótico y salino (Umeda *et al.*, 1994). Los cultivos en suspensión también son considerados importantes reactores para la obtención de productos valiosos como endulzantes, farmacéuticos, saborizantes, fragancias, compuestos aromáticos y enzimas (Mühlbach, 1998).

Los cultivos celulares que desarrollan altos contenidos de clorofila (suspensiones celulares clorofílicas) ofrecen ventajas adicionales como modelo para el estudio de la biogénesis, genética y fisiología celular debido a que ciertos enzimas del metabolismo vegetal se encuentran localizadas en los cloroplastos (Wolfbain, 1992; Joyard *et al.*, 1998). Por ejemplo, en la ruta biosintética del ácido abscísico que es iniciada en los cloroplastos, se destacan las enzimas neoxantina epoxidasa (ZEP) que catalza la conversión de zeaxantina a trans-violaxantina, y la 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED) que catalza el primer paso que compromete la biosíntesis de ABA, al facilitar el corte de cis-xantofila para formar xanomica (Seo y Koshiba, 2002).

Según la fuente de energía que utilizan para su crecimiento, los cultivos pueden ser clasificados en cultivos celulares heterotróficos (H), fotoautotróficos (FH) y fotoautotróficos (FA) (Wolfbain, 1992). Los cultivos de células vegetales FA y FH poseen cloroplastos desarrollados y fisiológicamente activos para obtener toda (FA) o parte de su energía (FH) a partir de la fotosíntesis, con el empleo de las sales minerales adicidas al medio de crecimiento, así como el CO_2 y la luz suministrados de manera exógena a estos sistemas celulares (Rostoch y Sinha, 2002). Este contrasta con los sistema celulares H, los cuales no poseen cloroplastos y requieren necesariamente de la adición de sacarosa (u otro carbohidrato) al medio de cultivo para poder crecer. Los cultivos FH constituyen una interfase entre los sistemas anteriores y se definen como los cultivos que poseen la habilidad para sintetizar clorofila y asimilar CO_2 pero que además requieren de alguna fuente exógena de carbohidratos para su crecimiento (Nagai *et al.*, 1980). Es importante resaltar que algunos cultivos clorofílicos poseen, además, la capacidad de crecer bajo condiciones heterotróficas (crecimiento en ausencia de luz y la adición de alguna fuente de carbohidratos exógenos). Fotoautotróficos (crecimiento en presencia de luz y un suministro exógeno de CO_2 pero sin la adición externa de carbohidratos) o fotoinmixótrofos (crecimiento en presencia de luz con la adición de una fuente exógena de carbohidratos).

Los cultivos FA combinan las ventajas de los cultivos H con la autotrofía, como característica esencial de los cultivos vegetales. Los cultivos FA son sistemas biológicos experimentalmente valiosos para el análisis del metabolismo vegetal, particularmente el relacionado con los cloroplastos y la actividad fotosintética, así como con la producción de metabolitos secundarios específicos (Rostoch y Sinha, 2002).

Si bien la principal función de los cloroplastos es su participación en la fotosíntesis, estos organelos también participan en otras funciones fundamentales de las células vegetales como son la síntesis de aminoácidos, nucleótidos, lípidos, aminóxy y hormonas. La vía de la desoxixilulosa fosfato para la síntesis de terpenoides está localizada casi exclusivamente en los cloroplastos (Lange *et al.*, 2000); los primeros pasos de la biosíntesis de terpenoides del cloroplasto, empezando con isopentenil PP, se realizan en el estroma mientras que los pasos finales se asocian con la membrana interna (Eisenreich).

Por otro lado, los cloroplastos son un blanco importante dentro de la biotecnología del estrés hídrico (Hayashi *et al.*, 1997; Saiamoto *et al.*, 1998) debido al confinamiento de ciertos solutos compatibles, o osmitos (osmolitos) en su biosíntesis dentro de estos organelos. Por ejemplo, el osmorregulador glicina betaína se localiza principalmente en cloroplastos (Robinson y Jones, 1986) donde se supone que estabiliza el aparato fotosintético y por ende a la tasa fotosintética durante condiciones de estrés hídrico (Rhodes y Hanson, 1993). Las proteínas BADH (betaína aldehído deshidrogenasa) y colina monooxigenasa son enzimas involucradas en la biosíntesis de glicina betaína que se encuentran localizadas casi exclusivamente en el estroma de los cloroplastos (Weigel *et al.*, 1986; Bruneqiux *et al.*, 1989). Asimismo, los cloroplastos son un importante centro de producción de especies reactivas de oxígeno durante el estrés hídrico (Nuccio y Foyer, 1998), por lo que cuentan con sistemas de detoxificación para la inactivación de radicales oxígeno y H_2O_2 que se generan en situaciones de deficiencia de agua (Bohnert y Shen, 1999), y en estos plastidios se localiza la enzima zeaxantina epoxidasa que lleva a cabo la primer reacción de la biosíntesis de ABA mediante una epoxidación de la zeaxantina en antheraxantina y violaxantina (Marin *et al.*, 1996).

A pesar de sus ventajas como modelo de estudio, el establecimiento y mantenimiento de cultivos FA es un proceso largo y difícil, por lo que existen pocos reportes al momento sobre estos sistemas celulares. La mayoría publicados en las décadas de los 80's y 90's. En esta revisión se presentan algunas características de los cultivos FA. Las estrategias para lograr su establecimiento existente su crecimiento, así como las aplicaciones potenciales de estos sistemas, particularmente las relacionadas con la producción de biocombustibles.

LÍNEAS CELULARES FOTOSINTÉTICAS: 46 AÑOS DE INVESTIGACIÓN

El primer cultivo fotoautotrófico (FA) en suspensión fue establecido para la especie *Nicotiana tabacum* (Bergmann, 1967). En este sistema se describió el uso de dióxido de carbono como única fuente de carbono y el efecto de dos axinas sobre la fijación fotosintética de carbono en las células cultivadas. Los cultivos FA de briófitos como *Marchantia polyacea* var. Diptera (Tara *et al.*, 1995) y de muchas especies de plantas superiores de la división Antofita han sido descritos también en la literatura. Muchas especies de la familia Solanaceae son capaces de crecer bajo condiciones fotoautotróficas, incluyendo *Nicotiana tabacum* (Bergmann, 1967), *N. plumbaginifolia* (Bey *et al.*, 1989), híbridos de *N. tabacum* x *N. glutinosa* (Goldstein y Widholm, 1980), *Solanum tuberosum* (Lafleur *et al.*, 1996), *Lycopersicum esculentum* y *L. pennivianum* (Stocker *et al.*, 1993). En el Cuadro 1 se muestra una lista de diversidades y híbridos capaces de crecer fotoautotróficamente. Por lo general, estas líneas celulares se caracterizan por tener tasas de crecimiento bajas con tiempos de duplicación oscilan entre 1.5 y 3.0 d, para los cultivos celulares H, las tasas de duplicación varían entre 0.6 y 3.0 d (Santamaría, 2008).

Por otro lado, aunque se han descrito diferentes cultivos celulares para cereales (Bhaskaran y Smith, 1990) y pastos (Akibowuia, 1989), existen solo tres reportes de cultivos *in vitro* de células vegetales no diferenciadas con alto contenido de clorofila (Cuadro 2). Las posibles explicaciones a este hecho incluyen la ausencia de multifunidad de formación de clorofila en las células verdes (Wolfbain, 1992) y las altas concentraciones de auxinas requeridas para la inducción de callos en las gramíneas (Yamada, 1985), algunas de las cuales pueden inhibir la síntesis de clorofila, por ejemplo el regulador 2,4-D (Yamada y Sato, 1978).

En los pocos trabajos en los que se han logrado desarrollar cultivos clorofílicos en gramíneas se incluyen los realizados en el pasto *Bouteloua gracilis*, en los cuales se mencionan la generación de suspensiones celulares FH con potencial de regeneración (Aguado-Santacruz *et al.*, 2001; García-Valenzuela *et al.*, 2005); los otros dos corresponden al cultivo de callos verdes de *Zea mays* (Lavergne *et al.*, 1992; Vargas-Suárez *et al.*, 1996). Aunque no se prohíbe el crecimiento fotoautotrófico de las líneas celulares de *B. gracilis*, la velocidad de crecimiento y los niveles de clorofila fueron suficientes para el establecimiento de este cultivo.

El establecimiento de cultivos FA a partir de gramíneas es una tarea difícil que no ha sido lograda satisfactoriamente. El uso de cultivos heterotróficos con altos contenidos de clorofila como material de inicio podría ser el primer paso para alcanzar esta meta (Wolfbain, 1992). Trabajos previos con callos obtenidos de maíz mostraron que la sacarosa es incapaz de promover cultivos FM estables (Solís *et al.*, 1989). Se ha demostrado que la glucosa promueve la iniciación del color verde en el callo, aunque limita los niveles de clorofila (Lavergne *et al.*, 1992). La reciente identificación del factor de transcripción OsGLK1 que regula el desarrollo de los cloroplastos ha hecho posible el establecimiento de cultivos celulares verdes, aun en gramíneas (Nakamura *et al.*, 2009). Las estrategias para lograr cultivos FA de gramíneas tienen que contrarrestar los conflictos ambientales del cultivo así como en los requerimientos nutricionales, como el balance entre auxinas y citocininas, asociados para inducir el crecimiento de las células clorofílicas, nutrientes inorgánicos, intensidad de luz, temperatura y composición de la fuente gaseosa. Es otra sentido es importante mencionar que la inducción de callos de cereales necesita altas cantidades de auxinas en el medio, lo cual inhibe la diferenciación de los cloroplastos (Yamada, 1985).

OPTIMIZACIÓN DEL ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS FA

En las décadas pasadas se han logrado progresos considerables para estimular la producción de biomasa y clorofila en los cultivos celulares FA. Entre las estrategias adoptadas para mejorar el crecimiento de estos cultivos destacan: (a) Obtención de líneas celulares con una alta tasa de crecimiento intrínseca; (b) Modificaciones al medio para obtener un mayor crecimiento; (c) Modificación de variables de proceso; y (d) Escalamiento de cultivos celulares en biorreactores. Uno de los factores más importantes para el establecimiento de cultivos FA exitosos es la selección de líneas celulares con alto potencial fotosintético, lo cual se logra seleccionando células que posean alta tasa de crecimiento y acumulación de clorofila, así como cloroplastos bien desarrollados (Yamada y Sato, 1978; Sato, 2013).

La disponibilidad de nutrientes es otro de los principales factores en el cultivo de células vegetales *in vitro* que afecta la acumulación de la biomasa y la biosíntesis de metabolitos (Pack *et al.*, 2009). Los medios comúnmente utilizados para el crecimiento de los cultivos celulares FA son: Murashige & Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962) y Linsmaier & Skoog (LS) (Linsmaier y Skoog, 1965).

En cuanto a la adición de azúcares, se ha comprobado que la sacarosa inhibe la actividad fotosintética y el desarrollo de los cloroplastos de las células cultivadas (Yamada, 1985). Se han realizado estudios relacionados con la influencia de la adición de carbohidratos sobre el crecimiento y acumulación de clorofila en cultivos FM. Las principales conclusiones encontradas muestran que los azúcares rápidamente utilizables como sacarosa, glucosa, fructosa y maltosa inhiben la acumulación de clorofila, mientras que otros carbohidratos como rafinosa, inulina y almidón son aprovechados lentamente lo cual limita el crecimiento del cultivo pero favorece el desarrollo de los cloroplastos (Xu *et al.*, 1988).

La concentración de nitrógeno afecta el nivel de las proteínas y aminoácidos en los cultivos de células vegetales. La adición de aminoácidos y los niveles generales de nitrógeno total han mostrado un efecto marcado sobre el crecimiento y desarrollo de las células vegetales. Numerosos hechos experimentales indican que el amonio podría jugar un papel regulador en muchos procesos dentro de

Cuadro 1. Continuación.

Especie	Medio basal	Reguladores de crecimiento	(µM)	Irradiancia (µmol fotón/m²s) [Fotoperiodo]	CO_2 en aire (%)	[X] (g/L) MS	µ (d⁻¹)	Referencia
Nicotiana tabacum×*Nicotiana glutinosa*	KTP* [MS]	Picloram	0.5	200 [continuo]	5	DNIR	0.06	Goldstein y and Widholm (1980)
		ANA	5.4					
		Cinetina	0.93					
Nicotiana tabacum	MS	ANA	10.7	100 [18/6]	2	4-4 (15 d)	DNIR	Carnier *et al.* (1989)
		BA	0.89					
Nicotiana tabacum	MS	ANA	1	100 [continuo]	2	1.22 (28 d)	0.04	Hammer y Barz (1999)
		Cinetina	2.3					
Mentha piperita	B5	2,4-D	9	90 [continuo]	2	4.8 (14 d)	0.03	Igbarbia *et al.* (1995)
		ANA	2.7					
		AIA	2.9					
		Cinetina	0.93					
Pogonatum harmodi	MS	2,4-D	0.1	150 [continuo]	2	DNIR	DNIR	Bunt *et al.* (1998)
		ANA	0.1					
Ruta graveolens	H	ANA	5.2	30 [continuo]	1 en N_2	DNIR	DNIR	Gresham (1978)
		Cinetina	0.93					
Solanum tuberosum	MS	2,4-D	14	90 a 110 [18/6]	2	10 (28 d)	0.09	LaFleur *et al.* (1996)
		Cinetina	0.93					

MS: medio Murashige & Skoog (Murashige y Skoog, 1962); L5: medio Linsmaier & Skoog (Linsmaier y Skoog, 1965); H: medio Gamborg (Gamborg *et al.*, 1968); B5: medio Gamborg (Gamborg *et al.*, 1968); KTP*: medio modificado de Kao (Kao, 1975); ANA: ácido 2,4 diclorofenoxiacético; BA: benciladenina-purina; AIA: ácido indol acético; MS: masa seca; [X]: concentración de biomasa final; µ: velocidad de crecimiento exponencial; DNIR: dato no reportado.

las células vegetales, tales como el crecimiento celular (Mohanty y Hitcher, 1978), biosíntesis de las poliacetidinas de la pared celular (Cantor y Orsolic, 2005), síntesis de proteínas (Mohanty y Hitcher, 1980), actividad de las enzimas de asimilación de nitrógeno (Lotz y Vopbaker, 2004), fijación heterotrófica de CO_2 (Wright y Gitan, 1988), y movilización del nitrato vacuolar (Beck y Renner, 1989). Amonio podría tener acción regladora sobre la síntesis enzimática (Mohanty y Hitcher, 1978), el pH cloplasmático (Wright y Gitan, 1980) y en los procesos de transporte de membrana (Beck y Renner, 1989).

El metabolismo del nitrógeno ha sido estudiado exterior-mente con cultivos FA de Chlorophytum rubrum. Estos cultivos mostraron un consumo preferencial del amonio (NH_4^+) en la primera semana, seguido por la absorción tanto de amonio como de nitrato (NO_3^-) (Campbell *et al.*, 1984). En otra investigación se demostró que la adición de NH_4^+ a los cultivos FA que crecieron en un medio con NO_3^- como única fuente de nitrógeno, incrementó la actividad de la enzima nitrato reductasa por movilización y por estimulación de la absorción de nitrato (Peters *et al.*, 1995). Por otro lado, en cultivos FA de soya (*Glycine max Merr.*) se reportó una correlación positiva entre el contenido de nitrógeno inicial del medio y el contenido de clorofila celular (Hoon y Wolfbohn, 1994).

La concentración de reguladores de crecimiento es un factor crucial en la acumulación de biomasa. El tipo y concentración de auxinas o citocininas y la relación auxina/citocinina ejercen significativamente tanto el crecimiento como la formación de las células (Ramachandra y Ravishankar, 2002). Los reguladores de crecimiento son importantes para la obtención de células fotosintéticas. El ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) es una auxina usada para la inducción y propagación de callos, pero inhibe la síntesis de clorofila y por tanto a la fotosíntesis (Bergmann, 1967; Hoarmann y Barz, 1972; Yamada y Sato, 1978). El ácido indol acético (AIA), una auxina natural, es favorable pero se descompone fácilmente bajo iluminación. Ensayos realizados con ácido naftalenacético (ANA) muestran que este regulador de crecimiento es más efectivo que el ácido 3-indolbutírico (IBA) y el 2,4-D para promover la síntesis de clorofila (Wolfbohn, 1992). El uso de citocinina estimula el desarrollo de cloroplastos. En particular, la cinetina incrementa los niveles de clorofila, el número de cloroplastos por célula y el grado de desarrollo de los tilacoides. Varios investigadores recomiendan adicionar BA

Cuadro 1. Características de crecimiento de cultivos celulares FA.

Especie	Medio basal	Reguladores de crecimiento	(µM)	Irradiancia (µmol fotón/m²s) [Fotoperiodo]	CO_2 en aire (%)	[X] (g/L) MS	µ (d⁻¹)	Referencia
Anacystis marchica	MS	Cinetina	0.93	300 [continuo]	5	DNIR	0.03	Xu *et al.* (1988)
		Picloram	0.5					
		ANA	5.4					
Anacystis nidulans	MS	Cinetina	0.93	300 [continuo]	5	7.02 (28 d)	0.03	Xu *et al.* (1988)
		Picloram	0.5					
		ANA	5.4					
Carthamus tinctorius	B5	ANA	5.4	100 [continuo]	2	19.17 (30 d)	0.14	Tyler *et al.* (1986)
		Cinetina	4.6					
Chlorophytum rubrum	MS	2,4-D	0.1	87 [continuo]	0.3 a 1	0.2-0.5 (14 d)	0.04	Hildemann y Barz (1977)
Chlorophytum rubrum	MS	2,4-D	0.1	120 [continuo]	2	1.3-3 (14 d)	0.14	Hildemann *et al.* (1979)
Chlorophytum rubrum	MS	2,4-D	0.01	120 [continuo]	2	3 (14 d)	0.30	Hoarmann (1981)
Datura innoxia	MS	Picloram	0.5	300 [continuo]	5	5-8 (28 d)	0.05	Xu *et al.* (1988); Goldstein y Widholm (1980)
		ANA	5.4					
		Cinetina	0.93					
Daucus carota	DKR	AIA	11.4	110 a 120 [continuo]	0.035	DNIR	0.03	Deutzer *et al.* (1985)
		Cinetina	0.46					
Dianthus caryophyllus	MS	ANA	10.8	120 [continuo]	1	5.3 (24 d)	0.07	Rebella *et al.* (1984)
		BA	0.89					
Digitalis purpurea	MS	AIA	5.7	90 [continuo]	1	8.1 (21 d)	DNIR	Hagimori *et al.* (1982)
Euphorbia characias	MS	Sin reguladores de crecimiento		150 [18/6]	2	DNIR	0.11	Rebella *et al.* (1984)
Glycine max	MS	ANA	5.4	200 a 300 [continuo]	5	5.5 (11 d)	0.17	Wurz *et al.* (1981)
		Cinetina	0.93					
Gossypium hirsutum	MS	ANA	5.4	200 [continuo]	5	21.6 (40 d)	0.05	Blair *et al.* (1988)
		Cinetina	0.93					
Gossypium hirsutum	MS	ANA	5.4	300 [continuo]	0.035	3.26 (24 d)	0.09	Xu *et al.* (1988)
		Cinetina	0.93					
		Picloram	0.5					
Nicotiana tabacum	MS	ANA	5.37	75 [continuo]	1	6.58 (DNIR)	0.14	Bergmann (1967)
Nicotiana tabacum x *Nicotiana glutinosa*	MS	Picloram	0.5	300 [continuo]	5	8.64 (28 d)	0.05	Wurz *et al.* (1982); Xu *et al.* (1988)
		ANA	5.4					
		Cinetina	0.93					

MS: medio Murashige & Skoog (Murashige y Skoog, 1962); L5: medio Linsmaier & Skoog (Linsmaier y Skoog, 1965); H: medio Hildebrandt modificado (Cochran, 1978); N: medio Nitsch (Nitsch y Nitsch, 1969); B5: medio Gamborg (Gamborg *et al.*, 1968); ANA: ácido naftalenacético; 2,4-D: ácido 2,4 diclorofenoxiacético; BA: benciladenina-purina; AIA: ácido indol acético; MS: masa seca; [X]: concentración de biomasa final; µ: velocidad de crecimiento exponencial; DNIR: dato no reportado.