

MEDICION DE LA VIABILIDAD DE CELULAS VEGETALES USANDO UN SISTEMA EPIFLUORESCENTE Y ANALISIS DIGITAL DE IMAGENES

Lilia Miranda¹, Mainul Hassan², Patricia Larralde², Gabriela Trejo¹, Antonio Jiménez¹, Enrique Galindo² y Mario Rodríguez¹.

¹Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, IPN. Apdo. Postal 24, Yauatepec, Morelos, 62730 MEXICO. ²Instituto de Biotecnología, UNAM. Apdo. Postal 510-3. Cuernavaca, Morelos, 62250, MEXICO.

Fax (739) 4 18 96, e-mail: mirandalilia@hotmail.com

Palabras clave: *viabilidad, análisis de imágenes, células vegetales*

Introducción. Recientemente, el análisis de imágenes ha sido propuesto como una herramienta útil para determinar las características de células vegetales tales como: viabilidad, forma, tamaño y contenido de metabolitos secundarios (1). El uso de esta técnica reduce la subjetividad, permite la automatización y puede contribuir a un mejor entendimiento de las condiciones fisiológicas de las células presentes en el fermentador (2). Debido a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue establecer un método para la determinación de viabilidad en células vegetales mediante el uso de tinción diferencial y análisis de imágenes. Además, analizar el efecto de diferentes niveles de daño en el desarrollo de los cultivos.

Metodología. Se utilizaron cultivos en suspensión de células vegetales de *Cinchona robusta*, las cuales fueron sometidas a daño físico por medio de shock electromagnético en un horno de microondas (Samsung, modelo MW8610T), a diferentes tiempos de exposición. Las células fueron observadas en un microscopio (Nikon) y el análisis de imágenes se llevó a cabo con el sistema Image Pro Plus v1 (Media Cybernetics, USA). La viabilidad se determinó por medio de la diferencia de área de las células teñidas (vivas) con una solución de diacetato de fluoresceína (FDA) y el área de las células vistas en un campo de luz normal (células totales). Además, se realizaron pruebas de recrecimiento con células que fueron dañadas en diferentes grados. Los cultivos se sembraron en matraces Erlenmeyer de 125 mL siguiendo su crecimiento durante los siguientes 15 días.

Resultados y Discusión. En el cuadro 1 se observa el daño de las células de *C. robusta* en función del tiempo.

Cuadro 1. Porcentaje de viabilidad en células de *C. robusta* sometidas a daño por shock electromagnético*

Tiempo de exposición (s)	Biomasa viable (%)
0	83
6	78
9	74
12	39
15	16

*Potencia 5 (que corresponde al 5 % de 1400 W).

Los resultados muestran que a los 6 y 9 segundos de exposición, la viabilidad no es afectada de manera importante; sin embargo, la exposición durante 12 segundos

reduce al 39% la biomasa viable. Con el objeto de analizar como afecta el daño generado a las células en el desarrollo del cultivo, las células dañadas fueron recrecidas en medio líquido. Los resultados se muestran en la Figura 1.

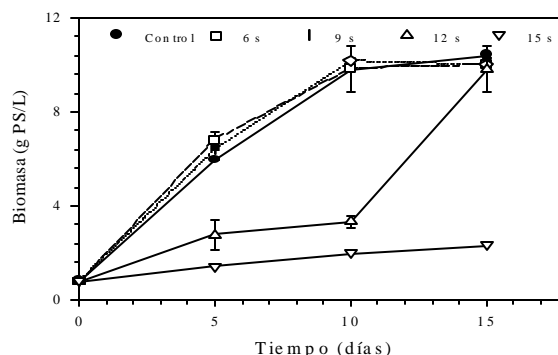


Figura 1. Prueba de recrecimiento de células de *C. robusta*.

Los cultivos dañados por 6 y 9 segundos crecieron en forma similar que el control (sin daño), mientras que las células dañadas por 12 segundos muestran una fase lag de hasta 10 días y posteriormente se observó una fase exponencial de crecimiento, alcanzando concentraciones de biomasa similares a la del control. En el caso de las células expuestas durante 15 segundos, no se observó crecimiento. Los resultados sugieren que existe relación entre la viabilidad medida por análisis de imágenes y las pruebas de recrecimiento.

Conclusiones. Los resultados obtenidos muestran que dependiendo del porcentaje de daño ocasionado a los cultivos de *C. robusta* se puede afectar el desarrollo del cultivo retardando su fase lag o impidiendo su crecimiento.

Agradecimientos. Este trabajo fue financiado por la CGEPI 990499. Se agradece la colaboración del Dr. Gabriel Corkidi en el montaje del sistema de análisis de imágenes.

Bibliografía

- 1.- Miyanaga, K., Seki, M. and Furusaki, S. (2000). Analysis of pigment accumulation heterogeneity in plant cell population by image-processing system. *Biotechnol. Bioeng.* 67(4): 493-497.
- 2.- Flores, C., Hassan, M., Corkidi, G., Galindo, E., y Serrano-Carreón, L. (2001). Determinación de la viabilidad de biomasa micelial de *Trichoderma harzianum*. *IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*, Veracruz, Ver. (Sometido).