

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

PLANT CELL PHOTOAUTOTROPHIC SUSPENSION CULTURES. ESTABLISHMENT AND APPLICATION PERSPECTIVES

Luisa M. Gómez-Torres¹, Blanca Moreno-Gómez², Mario E. Velásquez-Lozano¹,
César Aguirre-Mancilla³ y Gerardo A. Aguado-Santacruz^{3*}

¹Departamento 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. 14306. ²Campo Experimental Bajío, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Km 6.5 Carr. Celaya-San Miguel de Allende. 38110, Celaya, Guanajuato, México. Tel y Fax 01 (461) 6115323. ³Programa de Posgrado, Instituto Tecnológico de Roque. Km 8 Carr. Celaya-Juventino Rosas. 38110, Celaya, Guanajuato, México. Tel 01(461) 6115903 Ext 135.

*Autor para correspondencia (gaguado@prodigy.net.mx, gaguados@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 descubrimiento, importante información sobre la fotosíntesis y la producción de metabolitos secundarios específicos. La disminución de los depósitos petrolíferos 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 bioetanol o biodiesel, como sistemas análogos a las cianobacterias. En esta revisión analítica sobre los cultivos celulares fotoautotróficos se establecen sus características esenciales y las estrategias empleadas para mejorar su crecimiento *in vitro*, con referencia a los cultivos celulares de estas 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, fotobiorreactores, cianobacterias.

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 photo-synthetic systems for producing biodiesel and bioethanol as alternative systems to cyanobacteria. 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, photobioreactor, cyanobacteria.

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 Scheibe, 1989; Widholm, 1992; Hampp *et al.*, 2012). 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 conformados de poblaciones uniformes de células que pueden ser crecidas 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 (Bressan *et al.*, 1982; Bhaskaran *et al.*, 1985; Tholakalabavi *et al.*, 1994; Leonardi *et al.*, 1995; Robertson *et al.*, 1995; Hawkins y Lips, 1997; Tholakalabavi *et al.*, 1997; Cazalé *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 clorofilicas) ofrecen ventajas adicionales como modelo para el estudio de la bioquímica, genética y fisiología celular debido a que ciertas enzimas del metabolismo vegetal se encuentran localizadas en los cloroplastos (Widholm, 1992; Joyard *et al.*, 1998). Por ejemplo, en la ruta biosintética del ácido abscísico que es iniciada en los cloroplastos, se destacan las enzimas zeaxantina epoxidasa (ZEP) que cataliza la conversión de zeaxantina a trans-violaxantina, y la 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED) que cataliza el primer paso que compromete la biosíntesis de ABA, al facilitar el corte de cis-xantofila para formar xantoxina (Seo y Koshiba, 2002).

Según la fuente de energía que utilizan para su crecimiento, los cultivos pueden ser clasificados en cultivos celulares heterotróficos (H), fotomixotróficos (FM) y fotoautotróficos (FA) (Widholm, 1992). Los cultivos de células vegetales FM y FA poseen cloroplastos desarrollados y fisiológicamente activos para obtener toda (FA) o parte de su energía (FM) a partir de la fotosíntesis, con el empleo de las sales minerales añadidas al medio de crecimiento, así como el CO₂ y la luz suministrados de manera exógena a estos sistemas celulares (Roitsch y Sinha, 2002). Esto contrasta con los sistemas 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 FM constituyen una interfase entre los sistemas anteriores y se definen como los cultivos que poseen la habilidad para sintetizar clorofila y asimilar CO₂ pero que además requieren de alguna fuente exógena de carbohidrato para su crecimiento (Nagai *et al.*, 1989). Es importante reiterar que algunos cultivos clorofilicos poseen, además, la capacidad de crecer bajo condiciones heterotróficas (crecimiento en ausencia de luz y la adición de alguna fuente de carbohidrato exógena), fotoautotróficas (crecimiento en presencia de luz y un suministro exógeno de CO₂ pero sin la adición externa de carbohidratos) o fotomixotróficas (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 autotrofia, como característica esencial de las células 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 (Roitsch 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, almidón 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 PPI, se realizan en el estroma mientras que los pasos finales se asocian con la membrana interna (tilacoide).

Por otro lado, los cloroplastos son un blanco importante dentro de la biotecnología del estrés hídrico (Hayashi *et al.*, 1997; Sakamoto *et al.*, 1998) debido al confinamiento de ciertos solutos compatibles, o enzimas involucradas 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; Brouquisse *et al.*, 1989). Asimismo, los cloroplastos son un importante centro de producción de especies reactivas de oxígeno durante el estrés hídrico (Noctor y Foyer, 1998), por lo que cuentan con sistemas de detoxificación para la inactivación de radicales oxígeno y H₂O₂ que se generan en situaciones de deficiencia de agua (Bohnert y Shen, 1999), y en estos plástidos 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 anteraxantina 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 mejorar 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 auxinas sobre la fijación fotosintética de carbono en las células cultivadas. Los cultivos FA de briófitas como *Marchantia paleacea* var. *Diptera* (Taya *et al.*, 1995) y de muchas especies de plantas superiores de la división Angiosperma 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* (Rey *et al.*, 1989), híbridos de *N. tabacum* x *N. glutinosa* (Goldstein y Widholm, 1990), *Solanum tuberosum* (LaRosa *et al.*, 1984), *Lycopersicum esculentum* y *L. peruvianum* (Stocker *et al.*, 1993). En el Cuadro 1 se muestra una lista de dicotiledóneas y briófitas capaces de crecer fotoautotróficamente. Por lo general, estas líneas celulares se caracterizan por tener tasas de crecimiento bajas con tiempos de duplicación ubicados entre 1.5 y 3.0 d; para los cultivos celulares H, las tasas de duplicación varían entre 0.6 y 5.0 d (Smetanska, 2008).

Por otro lado, aunque se han descrito diferentes cultivos celulares para cereales (Bhaskaran y Smith, 1990) y pastos (Ahloowalia, 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 uniformidad de formación de clorofila en las células verdes (Widholm, 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 menciona la generación de suspensiones celulares FM 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-Suarez *et al.*, 1996). Aunque no se probó 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 células fotomixotróficas con altos contenidos de clorofila como material de inicio podría ser el primer paso para alcanzar esta meta (Widholm, 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, aún en gramíneas (Nakamura *et al.*, 2009). Las estrategias para lograr células FA de gramíneas tienen que centrarse en las condiciones ambientales del cultivo así como en los requerimientos nutricionales, como el balance entre auxinas y citocininas, azúcares para

inducir el crecimiento de las células clorofílicas, nutrientes inorgánicos, intensidad de luz, temperatura y composición de la fase gaseosa. En este 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 mejor 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 (Paek *et al.*, 2005). 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 relación de amonio/nitrato 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. Características de crecimiento de cultivos celulares FA.

Especie	Medio basal	Reguladores de crecimiento	(μM)	Irradiancia ($\mu\text{mol fotón/m}^2\text{s}$) [Fotoperiodo]	CO_2 en aire (%)	[X] (g/L) MS	μ (d^{-1})	Referencia
<i>Amaranthus cruentus</i>	MS	Cinetina	0.93	300 [continuo]	5	DNR	0.05	Xu <i>et al.</i> (1988)
		Picloram	0.3					
		ANA	5.4					
<i>Amaranthus powellii</i>	MS	Cinetina	0.93	300 [continuo]	5	7.92 (28 d)	0.09	Xu <i>et al.</i> (1988)
		Picloram	0.3					
		ANA	5.4					
<i>Catharanthus roseus</i>	B5	ANA	5.4	100 [continuo]	2	15.12 (56 d)	0.04	Tyler <i>et al.</i> (1986)
		Cinetina	4.6					
<i>Chenopodium rubrum</i>	MS	2,4-D	0.1	87 [continuo]	0.5 a 1	6.1-8.9 (14 d)	0.06	Hüsemann y Barz (1977)
<i>Chenopodium rubrum</i>	MS	2,4-D	0.1	120 [continuo]	2	13.5 (14 d)	0.14	Hüsemann <i>et al.</i> (1979)
<i>Chenopodium rubrum</i>	MS	2,4-D	0.0	120 [continuo]	2	18 (14 d)	0.30	Hüsemann (1981)
<i>Datura innoxia</i>	MS	Picloram	0.3	300 [continuo]	5	5.4 (28 d)	0.05	Xu <i>et al.</i> (1988); Goldstein y Widholm (1990)
		Cinetina	5.4					
<i>Daucus carota</i>	DNR	AIA	11.4	100 a 120 [continuo]	0.035	DNR	0.03	Bender <i>et al.</i> (1985)
		Cinetina	0.46					
<i>Dianthus caryophyllus</i>	MS	ANA	10.8	120 [continuo]	1	5.3 (24 d)	0.07	Rebeille <i>et al.</i> (1988)
		BA	0.39					
<i>Digitalis purpurea</i>	MS	AIA	5.7	90 [continuo]	1	8.1 (21 d)	DNR	Hagimori <i>et al.</i> (1982)
<i>Euphorbia characias</i>	MS	Sin reguladores de crecimiento		100 [18/6]	2	DNR	0.11	Rebeille <i>et al.</i> (1988)
<i>Glycine max</i>	MS	ANA	5.4	200 a 300 [continuo]	5	5.5 (14 d)	0.17	Horn <i>et al.</i> (1983)
		Cinetina	0.93					
<i>Gossypium hirsutum</i>	MS	ANA	5.4	200 [continuo]	5	21.6 (40 d)	0.05	Blair <i>et al.</i> (1988)
		Cinetina	0.93					
<i>Gossypium hirsutum</i>	MS	ANA	5.4	300 [continuo]	0.035	3.96 (28 d)	0.09	Xu <i>et al.</i> (1988)
		Cinetina	0.93					
		Picloram	0.3					
<i>Nicotiana tabacum</i>	MS	ANA	5.37	75 [continuo]	1	0.38 (DNR)	0.14	Bergmann (1967)
<i>Nicotiana tabacum</i> x <i>Nicotiana glutinosa</i>	MS	Picloram	0.3	300 [continuo]	5	6.84 (28 d)	0.05	Horn <i>et al.</i> (1983); Xu <i>et al.</i> (1988)
		ANA	5.4					
		Cinetina	0.93					

MS: medio Murashige & Skoog (Murashige y Skoog, 1962); LS: medio Lismaier & Skoog (Linsmaier y Skoog, 1965); H: medio Hildebrandt modificado (Corduan, 1970); 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: bencilaminopurina; AIA: ácido indol acético; MS: masa seca; [X]: concentración de biomasa final; μ : velocidad de crecimiento exponencial; DNR: datos no reportados.

Cuadro 1. Contuniación.

Especie	Medio basal	Reguladores de crecimiento	(μM)	Irradiancia ($\mu\text{mol fotón/m}^2\text{s}$) [Fotoperiodo]	CO_2 en aire (%)	[X] (g/L) MS	μ (d^{-1})	Referencia
<i>Nicotiana tabacum</i> - <i>Nicotiana glutinosa</i>	KTP ^o (MS)	Picloram	0.3	250 [continuo]	5	DNR	0.06	Goldstein and Widholm (1990)
		ANA	5.4					
		Cinetina	0.93					
<i>Nicotiana tabacum</i>	MS	ANA	10.7	100 [18/6]	2	6.4 (15 d)	DNR	Carriere <i>et al.</i> (1989)
		BA	0.89					
<i>Nicotiana tabacum</i>	MS	ANA	1	100 [continuo]	2	1.22 (28 d)	0.08	Ikemeyer y Barz (1989)
		Cinetina	2.3					
		2,4-D	9					
<i>Morinda lucida</i>	B5	ANA	2.7	90 [continuo]	2	4.8 (14 d)	0.05	Igbavboa <i>et al.</i> (1985)
		AIA	2.9					
		Cinetina	0.93					
		2,4-D	0.1					
<i>Peganum harmala</i>	MS	ANA	0.1	120 [continuo]	2	DNR	DNR	Barz <i>et al.</i> (1980)
		ANA	0.1					
<i>Ruta graveolens</i>	H	ANA	0.2	30 [continuo]	1 en N_2	DNR	DNR	Corduan (1970)
		Cinetina	0.02					
<i>Solanum tuberosum</i>	MS	2,4-D	14	90 a 110 [15/9]	2	10 (28 d)	0.09	LaRosa <i>et al.</i> (1984)
		Cinetina	0.93					

MS: medio Murashige & Skoog (Murashige y Skoog, 1962); LS: medio Lismaier & Skoog (Linsmaier y Skoog, 1965); H: medio Hildebrandt modificado (Corduan, 1970); 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: bencilaminopurina; AIA: ácido indol acético; MS: masa seca; [X]: concentración de biomasa final; μ : velocidad de crecimiento exponencial; DNR: datos no reportados.

las células vegetales, tales como el crecimiento celular (Mohanty y Fletcher, 1978), biosíntesis de los polisacáridos de la pared celular (Günter y Ovodov, 2005), síntesis de proteínas (Mohanty y Fletcher, 1980), actividad de las enzimas de asimilación de nitrógeno (Leleu y Vuylstekker, 2004), fijación heterotrófica de CO_2 (Wright y Givan, 1988), y movilización del nitrato vacuolar (Beck y Renner, 1989). También podría tener acción reguladora sobre la síntesis enzimática (Mohanty y Fletcher, 1978), el pH citoplasmático (Wright y Givan, 1988) y en los procesos de transporte de membrana (Beck y Renner, 1989).

El metabolismo del nitrógeno ha sido estudiado extensivamente con cultivos FA de *Chenopodium 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 (Horn y Widholm, 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 altera 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; Hüsemann y Barz, 1977; 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) o el 2,4-D para promover la síntesis de clorofila (Widholm, 1992). El uso de citocininas 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 2. Cultivos FM y FA obtenidos en monocotiledóneas.

Especie	Material generado	Medio basal/ Fuente de carbono (g/L)	Reguladores de crecimiento (mg/L)		Irradiancia (μmol fotón/m² s) [fotoperiodo]	Incremento en peso fresco (%)	Clorofila total (μg/g peso fresco)	Referencia
<i>Asparagus officinalis</i>	Suspensión	N 1 % CO ₂ en aire	ANA	5.4	130 [continuo]	100	DNR	Chaumont y Gudin (1985)
			Cinetina	0.4				
<i>Asparagus officinalis</i>	Suspensión	MS 2 % CO ₂ en aire	ANA	5.4	120 [16/8]	DNR	100 a 440	Peel (1982)
			Cinetina	2.3				
<i>Bouteloua gracilis</i>	Suspensión	MS sacarosa (30)	2,4 D	1	55 [continuo]	323	116	Aguado-Santacruz <i>et al.</i> (2001)
			BA	2				
			Adenina	40				
<i>Bouteloua gracilis</i>	Suspensión	MS + polietilen glicol 8000 sacarosa (30)	2,4 D	1	55 [continuo]	800-3500	368.1	García-Va-lenzuela <i>et al.</i> (2005)
			BA	2				
			Adenina	40				
<i>Zea mays</i>	Callos	MS glucosa (10)	Acido picolínico	10	115 [18/6]	269	110	Lavergne <i>et al.</i> (1992)
			Cinetina	0.2				
<i>Zea mays</i>	Callos	MS modificado almidón aire + 3 % CO ₂	Cinetina	0.2	180 [16/8]	DNR	11	Vargas-Suárez <i>et al.</i> (1996)

MS: medio Murashige & Skoog (Murashige y Skoog, 1962); N: medio Nitsch (Nitsch y Nitsch, 1969); MS modificado: (Sánchez-de-Jiménez *et al.*, 1988); ANA: ácido naftalenacético; 2,4-D: ácido 2,4 diclorofenoxiacético; BA: benzilaminopurina; DNR: datos no reportados.

o cinetina al medio de cultivo (Yamada, 1985).

La variación de las condiciones ambientales como luz, temperatura, pH del medio y altas concentraciones de CO₂ han sido estudiadas por sus efectos sobre el establecimiento de cultivos FA (Roitsch y Sinha, 2002). La intensidad, la calidad espectral de la luz y el fotoperiodo pueden afectar los cultivos de células vegetales. Se ha encontrado que los cultivos vegetales que crecen con intensidades bajas de luz (40 a 60 μmol fotón/m² s) muestran menor contenido de carotenoides, arreglos tilacoidales irregulares, tasas de transporte de electrones reducidas, baja eficiencia de carboxilación (menor contenido y actividad de Rubisco) y por lo tanto bajas tasas fotosintéticas (Fuentes *et al.*, 2006). En cultivos celulares FA la iluminación se suministra continuamente con lámparas fluorescentes que proveen un nivel de iluminación adecuado para crecimiento fotoautotrófico entre 6000 a 10,000 lux (100 a 300 μmol fotón/m²s); según Widholm (1992) la luz continua suministra mayor energía y disminuye las pérdidas por respiración. Cultivos FA de *Euphorbia* y *Asparagus* crecieron con fotoperiodos de 18 y 16 h respectivamente, lo cual permite la expresión de los procesos metabólicos normales que ocurren en las plantas durante la noche, como por ejemplo la utilización de almidón (Roitsch y Sinha, 2002).

El intervalo de temperatura de 17 a 25 °C se usa normal-

mente para la inducción de callo y el crecimiento de cultivos FA. Sin embargo, cada especie vegetal posee sus propios valores óptimos de temperatura. Por otro lado, el pH del medio usualmente se ajusta entre 5 y 6 antes de la esterilización y no se controla durante el desarrollo del cultivo. La concentración de iones hidrógeno en el medio cambia durante el desarrollo del mismo. El pH del medio decrece durante la asimilación de amonio y se incrementa durante el consumo del nitrato (McDonald y Jackman, 1989). Un ejemplo que comprueba esta relación entre el pH de la actividad celular y el medio de cultivo es el que ofrece Hüsemann *et al.* (1992), en el que los cultivos de células fotoautotróficas de *C. rubrum* mostraron un incremento en el pH externo de 4.5 a 6.3, mientras que el pH citosólico aumentó en 3 unidades y el pH vacuolar en 1.3 unidades .

El enriquecimiento de la atmósfera con CO₂ promueve la fotosíntesis y el crecimiento celular en los cultivos vegetales FA (Roitsch y Sinha, 2002). La mayoría de los cultivos FA crecen en presencia de 1 % o mayores niveles de CO₂ en el aire. Hasta la fecha solamente las especies *Dianthus caryophyllus*, *Euphorbia* sp, *Chenopodium rubrum*, *Gossypium hirsutum*, *Glycine max*, así como un híbrido de *Nicotiana tabacum* x *Nicotiana glutinosa* son capaces de crecer fotoautotróficamente con los niveles de CO₂ normales del aire (0.035 %) (Widholm, 1992).

CULTIVOS CELULARES FA EN BIORREACTORES

Pocos cultivos vegetales FA se han propagado en biorreactores, y los que existen utilizan principalmente reactores de tanque agitado y reactores tipo “airlift” (de inyección de aire), con volúmenes nominales que no exceden de 20 L, en contraste con los cultivos celulares H que se han llevado a volúmenes industriales superiores a 75,000 L (Cuadro 3). Los principales problemas encontrados en el crecimiento de células vegetales a nivel de biorreactor se relacionan con el suministro de luz a las células; en muchos casos, el crecimiento fotoautotrófico exhibe bajas tasas de crecimiento comparado con las células que crecen bajo condiciones fotomixotróficas o heterotróficas, por lo cual persisten solamente por cortos periodos de tiempo en crecimiento por lote (las excepciones son las líneas celulares de *Asparagus officinalis* y *Glycine max*).

Los dos trabajos de cultivos FA de *Asparagus officinalis* demostraron un rápido crecimiento de la biomasa (Peel, 1982; Chaumont y Gudín, 1985), pero no hay información adicional reportada para estos cultivos. En cuanto a la línea celular FA de *Glycine max* se reportó que ha crecido continuamente por muchos años bajo condiciones FA, por lo cual ha mejorado gradualmente sus características fotosintéticas, hasta alcanzar valores similares de clorofila a los encontrados en las hojas de esta especie (Widholm, 1992). Por otro lado, los fotobiorreactores requieren una gran superficie para iluminación, por lo que las paredes del reactor deben ser construidas de material transparente, mientras que el espesor del tanque debe ser relativamente delgado para permitir la máxima penetración de luz, por lo cual este

tipo de factores técnicos limitan el tamaño de este tipo de reactores.

Los fotobiorreactores se caracterizan por el control de importantes parámetros biotecnológicos y porque reducen el riesgo de contaminación, no hay pérdidas de CO₂, las condiciones del cultivo son reproducibles, se controla la temperatura y la hidrodinámica, y además los diseños son flexibles. Adicionalmente, las células fotoautotróficas, tanto las microalgas como las células vegetales FA cultivadas en biorreactores, requieren condiciones diferentes a las estudiadas tradicionalmente con microorganismos, particularmente en cuanto a la disponibilidad de luz, el balance de CO₂/O₂, la temperatura, la salinidad, los nutrientes, el pH del medio y la turbulencia, ya que todos estos parámetros tienen gran influencia en la fotosíntesis (Treat *et al.*, 1990; Pulz, 2001).

La luz como fuente de energía para la vida fotoautotrófica es el principal factor limitante en la fotobiotecnología. Algunas especies de algas crecen con velocidades óptimas a 50 µmol fotón/m²s y son fotoinhibidas a 130 µmol fotón/m²s, mientras que las células vegetales FA a nivel de biorreactor han sido cultivadas entre 110 y 420 µmol fotón/m²s, según la especie (Cuadro 3). La mayoría de los cultivos agrícolas se adaptan fácilmente a densidades de flujo de fotones mucho más altas, de aproximadamente 900 µmol fotón/m²s (Pulz, 2001). Los fermentadores agitados con varios elementos luminosos sumergidos permiten obtener una productividad del orden de 100 a 1000 mg MS/d para microalgas.

Cuadro 3. Cultivos celulares FA crecidos a nivel de biorreactor.

Especie	Tipo de reactor [Volumen]	Modo de operación	CO ₂ en aire (%)	Irradiancia (µmol fotón/m ² s)	µ (d ⁻¹)	[X]	Referencia
<i>Chenopodium rubrum</i>	“airlift” [1.5 L]	Discontinuo	2	110	0.09	1.5 x 10 ⁶ células/mL	Hüsemann (1982)
<i>Chenopodium rubrum</i>	“airlift” 2 L	Continuo	2	140	0.16	1.1 x 10 ⁶ células/mL	Hüsemann(1983)
<i>Chenopodium rubrum</i>	“airlift” 20 L	Semi-continuo	3	420	0.22	2.9 g/L (MS)	Fischer <i>et al.</i> (1994)
<i>Chenopodium rubrum</i>	“airlift” 20 L	Discontinuo	1 5	104 420	0.11 0.22	1.6 g/L 2.5 g/L (MS)	Fischer y Alfermann (1995)
<i>Glycine max</i>	Tanque agitado 5 L	Discontinuo	5	300	0.18	6.0 g/L (MS)	Treat <i>et al.</i> (1990)
<i>Nicotiana tabacum</i>	Tanque agitado [5 L]	Discontinuo	1	110	0.06	7.0 mg/L (PF)	Yamada <i>et al.</i> (1981)
<i>Spinacia oleracea</i>	Tanque agitado [1.7 L]	Continuo	1	120	0.14	DNR	Dalton (1980)

PF: peso fresco; MS: masa seca; [X]: concentración de biomasa final; µ: velocidad de crecimiento exponencial; DNR: datos no reportados.

Para lograr altas tasas de fotosíntesis, el balance de CO_2/O_2 tiene que ser ajustado en función de los requerimientos de la enzima Rubisco que facilita el suministro de CO_2 para el ciclo de Calvin y limita el uso del O_2 para la fotorrespiración. Por tanto, en cultivos de algas en altas densidades debe haber suficiente CO_2 disponible, mientras que el O_2 liberado tiene que ser removido antes que alcance concentraciones inhibitorias. El problema que representa la fotorrespiración aún no está completamente resuelto en los cultivos FA. El oxígeno puede llegar a ser un problema en cultivos de algas a altas densidades por la limitación en la tasa de fotosíntesis y porque aun cuando el CO_2 sea suministrado de forma óptima, la producción de oxígeno puede alcanzar fácilmente concentraciones sobre 40 mg/L, mientras que la radiación puede ocasionar la producción de radicales de oxígeno durante el intercambio de gases de la respiración y causar efectos tóxicos sobre las células debido a daño en las membranas. Las concentraciones de CO_2 se mantienen usualmente en márgenes muy estrechos. Mientras que la concentración de CO_2 del aire (0.035 %) es subóptima para el crecimiento de las plantas, la mayoría de las plantas tolerarían concentraciones solamente hasta 0.1 %. Sin embargo, para muchas especies de microalgas se ha observado que toleran concentraciones hasta 12 % de CO_2 a una temperatura de 35 °C, y los cultivos vegetales FA en biorreactor crecen a concentraciones entre 1 y 5 % de CO_2 .

La temperatura tiene mayor influencia en la respiración y la fotorrespiración que en la fotosíntesis. Cuando la fotosíntesis está limitada por el suministro de CO_2 o luz, la influencia de la temperatura no es significativa. Con un incremento en la temperatura la respiración se eleva significativamente, mientras que el flujo de CO_2 a través del ciclo de Calvin se incrementa sólo marginalmente; por tanto, la eficiencia neta de la fotosíntesis declina a altas temperaturas. Este efecto puede empeorar en cultivos en suspensión por la diferencia en la disminución de la solubilidad de CO_2 y O_2 a temperaturas elevadas.

Un suministro suficiente de nutrientes para microalgas es una condición indispensable para una fotosíntesis óptima. Las deficiencias pueden causar perturbaciones en el metabolismo y producción desproporcionada de intermediarios de la fotosíntesis. La desviación del pH óptimo, condiciones osmóticas y salinidad causan reacciones fisiológicas y problemas de productividad. Por tanto, estas condiciones fácilmente controlables deben ser mantenidas en relaciones óptimas en los fotobiorreactores. La fuente de carbono parece ser importante para algunos sistemas de producción de biomasa mixotróficos o heterotróficos. Las algas viven en su ambiente natural a densidades de 103 células/mL y distancias de más de 1 μm entre ellas. En cultivos de alta densidad de algas (*i.e.*, más de 109 células/mL) las condiciones naturales no son adecuadas para lograr altas producti-

vidades (Pulz, 2001).

En la literatura se mencionan avances en el desarrollo de nuevos tipos de fotobiorreactores para el crecimiento de microorganismos fotosintéticos. Muchas configuraciones de fotobiorreactores han sido evaluadas experimentalmente y cada una tiene ventajas y desventajas. El reactor tipo "airlift" y el reactor de columna burbujeada son sistemas adecuados para el crecimiento de microalgas, pero desafortunadamente su peor desventaja es la limitación de la disponibilidad de luz. En sistemas a gran escala existen limitaciones debido a la mala penetración de la luz cuando las células crecen a altas densidades.

Una solución para superar este inconveniente es emplear fibras ópticas. El fotobiorreactor tubular curvado es mejor que el tipo bucle tradicional para incrementar el rendimiento de biomasa. Los reactores en espiral son buenos para llevar a cabo la correcta exposición de las células a ciclos de luz-oscuridad, gracias al radio de curvatura de la espiral y a la buena relación superficie/volumen (Carlozzi, 2008). El fotobiorreactor en dos planos produce mayor biomasa que el fotobiorreactor de un solo plano. Los paneles planos son fotobiorreactores que requieren aire comprimido, inyectado en el fondo del panel, para mezclar el cultivo y remover el oxígeno producido por el proceso fotosintético. Los paneles planos, junto con columnas anulares y los tipos de fotobiorreactores tipo "airlift", permiten obtener una mezcla adecuada para que las microalgas crezcan, ya que son muy sensibles al estrés hidrodinámico. Muchos estudios también se han llevado a cabo sobre los efectos de la agitación del cultivo, tasa de flujo de aire, dimensiones de la burbuja y velocidad de entrada del aire al difusor (Carlozzi, 2008). Sin embargo, estas configuraciones de biorreactores son difíciles de utilizar en células vegetales FA debido a las estrictas condiciones de esterilidad que requieren para su crecimiento.

METABOLITOS SECUNDARIOS OBTENIDOS A PARTIR DE CULTIVOS FA

Muchas líneas celulares vegetales se han iniciado con el propósito de producir compuestos de alto valor agregado, utilizados principalmente en la industria farmacéutica y de alimentos. Muchos estudios comparan la producción de metabolitos secundarios en cultivos en suspensión H, FM y FA (Cuadro 4). Las líneas celulares FA exhiben características que pueden hacerlas muy convenientes para la producción de metabolitos secundarios ya que crecen a altas densidades, tienen tiempos de duplicación razonables y crecen en un ambiente que permite una fácil manipulación de factores que estimulan el incremento de las velocidades biosintéticas de los procesos biológicos involucrados en la obtención de los productos deseados.

Debido a su particular metabolismo fotosintético, los cultivos FA poseen un potencial único para la producción de metabolitos secundarios específicos, ya que el metabolismo primario hace disponible los precursores necesarios para la producción de los metabolitos secundarios, como los alcaloides lupanina y trigonelina (Wink y Hartmann, 1980; Ikemeyer y Barz, 1989), lipoquinonas (Igbavboa *et al.*, 1985) y compuestos volátiles aromáticos (Reil y Berger, 1996), entre otros.

CULTIVOS FA COMO MODELOS ALTERNATIVOS A LAS CIANOBACTERIAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES

La inminente necesidad de buscar fuentes energéticas alternativas a los combustibles fósiles ha impulsado el desarrollo de nuevas tecnologías de producción energética, que incluyen las relacionadas con la generación de bioetanol, butanol y biodiesel, entre otras. Los avances en la ingeniería metabólica proporcionan herramientas poderosas para utilizar microorganismos fotosintéticos en la producción de varios productos de aplicación industrial. Las células en suspensión FA de plantas superiores al igual que las microalgas (cianobacterias) capturan CO₂ mediante el ciclo de Calvin y lo convierten en una diversidad de compuestos orgánicos. Estos organismos fotosintéticos con requerimientos nutricionales sencillos (agua, luz, dióxido de carbono y sales), pueden producir durante su crecimiento cantidades considerables de carbohidratos, lípidos y proteínas en cor-

tos periodos (John *et al.*, 2011). Además, los organismos fotosintéticos no ocupan tierra cultivable y pueden ser una opción desde el punto de vista de sostenibilidad ambiental y conservación de los recursos naturales.

Recientes avances en la manipulación genética y la caracterización de las rutas metabólicas de las bacterias fotosintéticas abren la puerta a la ingeniería metabólica (Desai y Atsumi, 2013). En muchos estudios, genes heterólogos se expresan en estos microorganismos para mejorar la productividad o para producir un compuesto de interés. Después de la integración de estos genes en los microorganismos, la producción bioquímica objetivo se optimiza mediante la aplicación de métodos de ingeniería metabólica, tales como la eliminación de las rutas metabólicas competitivas o el mejoramiento de la actividad enzimática (Desai y Atsumi, 2013). Diversos estudios buscan optimizar las rutas metabólicas e incrementar la fijación de carbono (Ducat y Silver, 2012), lo cual se traduciría en un incremento de carbono en la célula y por tanto en la posibilidad de obtener una productividad mejorada. Se ha encontrado que la mayor fijación de carbono ocurre por el incremento de la expresión de los carboxisomas (Savage *et al.*, 2010) o la expresión heteróloga de los genes de Rubisco (*rbcLS*) (Atsumi *et al.*, 2009). En microalgas, el esfuerzo para incrementar la fijación de dióxido de carbono se ha llevado a cabo por la creación de un híbrido de la enzima Rubisco que contiene tanto unidades vegetales como de microalgas (Genkov *et al.*, 2010).

Cuadro 4. Comparación de la producción de metabolitos secundarios a partir de cultivos en suspensión fotoautotróficos, fotomixotróficos y heterotróficos.

Especie	Metabolito secundario	Concentración del metabolito (µg/g MS)				Referencia
		Planta	Cultivo FA	Cultivo FM	Cultivo H	
<i>Cicer arietinum</i>	Pinitol	19,400	970	0	0	Orthen <i>et al.</i> (2000)
<i>Digitalis purpurea</i>	Digitoxina	40	DNR	0.18	0.21	Hagimori <i>et al.</i> (1982)
<i>Lupinus polyphyllus</i>	Lupanina	8	DNR	11	DNR	Wink y Hartmann (1980)
<i>Morinda lucida</i>	Vitamina K1	34.1	9.7	4.5	0	Igbavboa <i>et al.</i> (1985)
	α-tocoferol	235	268.9	12.9	0	
	Plastoquinona	1288	568.3	160.7	0	
	Ubiquinona	34.3	40.7	3.2	0	
<i>Nicotiana tabacum</i>	Trigonelina	DNR	72	0	0	Ikemeyer y Barz (1989)
<i>Peganum harmala</i>	Alcaloides Harman	9000	0	22 a 55	767	Barz <i>et al.</i> (1980)
	Lípidos totales	DNR	101,000	56,000	31,000	
<i>Petroselinum crispum</i>	Graveolina	DNR	DNR	133	DNR	Reil y Berger (1996)

MS: masa seca; DNR: datos no reportados.

El uso de las cianobacterias para la producción de biodiesel y bioetanol comienza a ser más atractivo gracias a las ventajas de producir biomasa a partir de sustratos tradicionales (inclusive de materiales lignocelulósicos), y que pueden propiciar un rápido crecimiento, tiempos cortos de cosecha, y la capacidad de crecer estos microorganismos en sustratos sólidos y líquidos (Harun y Danquah, 2010). Además, la producción de biocombustibles a partir de organismos fotosintéticos que naturalmente no producen estos compuestos en altas cantidades se ha vuelto más factible con la ayuda de la ingeniería metabólica y la biología sintética. Recientemente se reportaron resultados relacionados con la transformación de células procariotas para la conversión de CO₂ en biocombustibles líquidos, que incluyen etanol, butanol, ácidos grasos, isoprenoides, alcoholes grasos e hidrocarburos (Dexter y Fu, 2009; Lindberg *et al.*, 2010; Lan y Liao 2011; Liu *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2011).

El etanol fue producido en concentraciones de 550 mg/L mediante la introducción de una piruvato descarboxilasa (PDC) y una alcohol deshidrogenasa (ADH) en la bacteria fotosintética *Synechocystis sp.* PCC 6803 (Dexter y Fu, 2009). Otra opción para la obtención de etanol a partir de los microorganismos FA consiste en el cultivo de las células, la recolección de la biomasa producida y el pretratamiento de la misma mediante su rompimiento mecánico o hidrólisis química o enzimática para liberar las largas moléculas de carbohidratos y dejar disponibles los azúcares fermentables para su posterior conversión a etanol u otros productos de interés industrial.

Los ácidos grasos también se han utilizado como precursores para la producción de biocombustibles. La producción de biodiesel implica el crecimiento de bacterias y la aplicación de un tratamiento para aumentar principalmente la producción de triacilglicerol (normalmente a través de la limitación del suministro de nitrógeno y el empleo de alta luminosidad o salinidad) y una transesterificación (Chisti, 2007). Se ha demostrado que la sobreexpresión de una acil-ACP sintetasa (*slr1609*) en *Synechocystis sp.* PCC 6803 permitió aumentar la activación de ácidos grasos y mejorar el rendimiento de la producción de alcohol graso (Gao *et al.*, 2012). Así, *Synechocystis sp.* PCC 6803 se modificó de tal manera que producía y secretaba ácidos grasos hacia a fuera de la célula (Liu *et al.*, 2011).

Las algas eucariotas también se utilizan para la producción de ácidos grasos, ya que pueden acumular lípidos hasta 70 % de su biomasa seca (Sivakumar *et al.*, 2012); sin embargo, existen limitaciones en el uso de tales algas, como la disponibilidad de herramientas genéticas debido a la complejidad del sistema eucariota (Desai y Atsumi, 2013). Por otro lado, se han identificado las condiciones de estrés y enzimas para la síntesis de ácidos grasos en el alga verde

Haematococcus pluvialis (Lei *et al.*, 2012), y también se han hecho estudios para optimizar las condiciones de luz para la producción de ácidos grasos en *Nannochloropsis* (Anandarajah *et al.*, 2012)

Una de las grandes ventajas de las cianobacterias es que pueden ser modificadas para lograr el rompimiento celular y liberar los biocombustibles en condiciones apropiadas (Hallenbeck, 2012). Adicionalmente a los biocombustibles, las bacterias fotosintéticas pueden ser utilizadas para la producción de hidrógeno, bioplásticos y antioxidantes. Estos químicos de alto valor agregado se han obtenido a través de ingeniería metabólica, expresión de genes heterólogos y la manipulación de las condiciones de crecimiento microbiano.

Se ha alcanzado tal progreso en este campo que ahora es posible realizar manipulaciones genéticas y mejorar la productividad de los compuestos de interés. Estos resultados aún no han sido aplicados a escala de producción industrial ya que se requieren grandes cantidades de materias primas a bajo costo, producción continua y altos volúmenes de insumos. Estas nuevas rutas de la producción autotrófica de biocombustibles son preliminares, y se necesitan muchos trabajos futuros para mejorar rendimientos de los productos y la optimización de las condiciones de operación y diseño de los biorreactores, lo que posibilitará que en un futuro próximo se pueda alcanzar la meta en la producción de biocombustibles y químicos a gran escala y con aplicaciones reales (Desai y Atsumi, 2013).

Las células vegetales FA en suspensión comparten muchas ventajas de las cianobacterias, como su posibilidad de ser transformadas genéticamente, aunque son células mucho más complejas. Sin embargo, muchos transgenes se han integrado y expresado de forma estable a través del genoma del cloroplasto de *Nicotiana tabacum* para conferir características agronómicas importantes que incluyen resistencia a herbicidas, insectos, enfermedades, tolerancia a sequía y sal, y fitorremediación. Por otra parte, muchos antígenos de vacunas y proteínas biofarmacéuticas se han expresado a niveles elevados a través del genoma del cloroplasto y su funcionalidad se ha evaluado en cultivos de células *in vitro* y modelos animales. Esta tecnología se ha extendido a otras especies vegetales para la introducción de características agronómicas y producción de antígenos de vacunas de bajo costo y proteínas terapéuticas. Además, la tecnología del cloroplasto es también una buena plataforma para la producción de productos industriales. Sin embargo, al momento no se ha explorado la posibilidad de considerar a las células FA como una alternativa al empleo de las cianobacterias para la producción de biocombustibles.

Recientemente, la tecnología de la manipulación de los

cloroplastos se ha extendido para la producción de enzimas utilizadas en la producción de etanol (Singh y Daniell, 2010). Un ejemplo de la tecnología del cloroplastos para la producción de biocombustibles tiene que ver con el gen *xynA* que fue transformado en cloroplastos de *Nicotiana tabacum* y dio como resultado la acumulación de xilanasa termoestable (Leelavathi *et al.*, 2003). Esta tecnología también se ha extendido a los sistemas de expresión para las diferentes enzimas responsables de la conversión de biomasa lignocelulósica en glucosa, durante la producción de etanol por fermentación (Verma *et al.*, 2010). Los microorganismos capaces de degradar celulosa secretan un sistema complejo de enzimas extracelulares, celulasas y xilanasas, que actúan en forma conjunta en la degradación de celulosa y hemicelulosa. Dos celulasas termoestables de *Thermobifida fusca*, Cel6A y Cel6B, se han expresado en cloroplastos de tabaco y los ensayos enzimáticos han demostrado que ambos son activos en la hidrólisis de la celulosa cristalina (Yu *et al.*, 2007; Gray *et al.*, 2009).

A pesar de los muchos logros en la transformación de cloroplastos, la aplicación extensiva a diferentes especies vegetales se ha visto obstaculizada por la falta de protocolos de transformación de plástidos para cultivos de interés agrícola. Algunos de los principales obstáculos incluyen el desarrollo de protocolos inadecuados para el cultivo *in vitro* de tejidos y de regeneración de plantas, falta de marcadores de selección eficientes y bajos niveles de expresión transgénica en plástidos no verdes. Los tejidos foliares son generalmente preferidos en dicotiledóneas para la transformación de plástidos, porque se producen rápidamente en grandes cantidades y permiten múltiples rondas sucesivas de selección y regeneración para lograr plantas homoplásmicas.

Desafortunadamente, la implementación de esta tecnología es difícil para los cultivos de cereales en los que se utiliza tejido no verde como explante, y no existen protocolos eficientes disponibles para la producción de plantas transplastómicas estables para la mayoría de las especies de cereales (Singh y Daniell, 2010). Adicionalmente, la poca disponibilidad de secuencias de genomas es otro de los obstáculos para extender esta tecnología a otros cultivos. Por tanto, es urgente secuenciar los genomas de cloroplastos para facilitar la transformación de especies vegetales, construir vectores de cloroplasto específicos para cada especie y desarrollar nuevos sistemas de selección eficientes para la transformación de plástidos de monocotiledóneas (Singh y Daniell, 2010).

Se requieren estudios fisiológicos, bioquímicos y moleculares que determinen las propiedades de la biomasa producida por las líneas celulares FA a escala de biorreactor y, con base en esta información, establecer la posibilidad de emplear esta biomasa para la generación de biodiesel o

bioetanol. Existe solamente una investigación relacionada con el cultivo a nivel de biorreactor de células fotoautotróficas de *Glycine max* (Treat *et al.*, 1990), en la cual se analizó el crecimiento celular y, con base en hidrólisis enzimática, las características de la biomasa producida.

La composición de la biomasa obtenida fotoautotróficamente fue 7.8 % lignina, 20.7 % celulosa, 23 % hemicelulosa, 5.5 % almidón, 14.5 % proteína y 6.5 % ácidos nucleicos; aunque las células obtenidas están compuestas principalmente por hexosas y pentosas (44 %), este material resultó ser recalcitrante a la digestión enzimática, al producir solamente 12.5 % de azúcares reductores. Al hacer pretratamiento alcalino con 1 % y 5 % de KOH y posteriormente hidrólisis ácida con 3 % de H₂SO₄, los azúcares reductores resultantes aumentaron a 15.4 y 20.7 % respectivamente (Treat *et al.*, 1990). Con base en estos resultados, se sugiere la manipulación genética para desarrollar líneas celulares altamente productivas y mayores niveles de biomasa hidrolizable.

La producción de biomasa FA y metabolitos de interés, que incluyen los biocombustibles, en ambientes controlados a nivel de biorreactor, actualmente es muy costosa. Los principales costos se derivan de las operaciones de extracción y separación. Las estrategias que faciliten estas operaciones deben ser perfeccionadas a fin de que las células liberen las moléculas de biocombustible al medio, ya sea a través de lisis celular o por secreción.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los cultivos en suspensión FA son sistemas ideales para la investigación básica y aplicada, con múltiples aplicaciones en las áreas de fisiología, bioquímica celular, ingeniería genética y biotecnología. Estos cultivos se han utilizado tradicionalmente como sistemas únicos para el análisis controlado de procesos fisiológicos, bioquímicos, citológicos y genéticos de plantas superiores a nivel celular. Los cultivos FA tienen las ventajas de los cultivos en suspensión H, en cuanto a que son fáciles de transferir, hay contacto directo entre las células y el medio, están constituidos por poblaciones celulares uniformes que crecen en condiciones controladas, libres de microorganismos y que pueden ser multiplicadas en diferentes configuraciones de biorreactores. Hasta la fecha no se ha valorado adecuadamente el potencial de estos cultivos para producir biomasa celulósica.

Una tecnología alternativa para la producción continua de biomasa, con bajos niveles de lignina y altas concentraciones de celulosa, podría ser lograda mediante el escalamiento a nivel de biorreactor de cultivos en suspensión fotosintéticos de plantas superiores. Entre las ventajas de estos sistemas de producción de biomasa sobre las tecnologías disponibles

actualmente, destacan: (a) Establecimiento de líneas celulares con altos niveles de celulosa y bajos niveles de lignina; (b) Biomasa con características homogéneas que permitirían la optimización de procesos como los pretratamientos y la hidrólisis; (c) La biomasa producida por hectárea sería mayor a la generada a través de los cultivos agrícolas; (d) Los biorreactores utilizarían la luz solar y el CO₂ generado por plantas industriales, lo cual representaría una alternativa para mitigar el calentamiento global y la escasez de agua en muchas zonas del mundo; (e) La producción de biomasa sería continua y no dependería de las condiciones ambientales.

La manipulación genética de cultivos FA no ha sido reportada. La transformación de cloroplastos tiene varias ventajas sobre la transformación nuclear y debe ser transferida a los cultivos FA en un futuro cercano. Los cultivos FA podrían ser muy útiles para elucidar rutas metabólicas que se presentan exclusivamente en los cloroplastos. Estas rutas metabólicas no ocurren en humanos ni en animales, lo que hace convenientes a los cultivos FA para la producción de antibióticos novedosos y vacunas. Por otro lado, el genoma de los cloroplastos presenta una oportunidad única para el campo de la biología sintética. La mayoría de los genomas de cloroplastos oscilan entre 150 y 205 kb, y muchos genomas se han secuenciado y están disponibles públicamente.

La transformación del genoma de los cloroplastos es una tecnología relativamente bien establecida en plantas y algas, por lo que estos genomas naturalmente minimizados y manipulables son de gran interés para la ingeniería metabólica de alimentos, biocombustibles y un sinnúmero de productos biológicos, por lo cual constituyen un objetivo idealmente conveniente para la biología sintética. Como puerta entre los mundos inorgánico y orgánico, el cloroplasto es un objetivo relevante en la ingeniería metabólica. Un aparato fotosintético mejorado puede conducir a aumentos en el rendimiento de los cultivos para alimentar a la población mundial en expansión, mediante el desarrollo de una industria química verde sostenible que contemple la viabilidad de la producción de biocombustibles con el empleo de algas, plantas o los cultivos FA.

AGRADECIMIENTOS

A la División de Investigación Sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia por su financiación dentro de la convocatoria Apoyo a Tesis de Programas de Posgrado, Proyecto Código 10944, y a la Secretaría de Educación Pública-Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de Colombia por el apoyo otorgado a través del convenio 82390.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguado-Santacruz G. A., J. L. Cabrera-Ponce, E. Ramírez-Chávez, C. G. León-Ramírez, Q. Rascón-Cruz, L. Herrera-Estrella and V. Olalde-Portugal (2001) Establishment, characterization and plant regeneration from highly chlorophyllous embryogenic cell cultures of blue grama grass, *Bouteloua gracilis* (H.B.K.) Lag. Ex Steud. *Plant Cell Reports* 20:131-136.
- Ahloowalia B. (1989) Cereals forage grasses: In: Handbook of Plant Cell Culture: Crop Species. P. V. Ammirato, D. A. Evans, W. R. Sharp, Y. Yamada (eds). McMillan Publishers Co. New York, US. pp:159-159.
- Anandarajah K., G. Mahendrapuram, M. Sommerfeld and Q. Hu (2012) Characterization of microalga *Nannochloropsis* sp. mutants for improved production of biofuels. *Applied Energy* 96:371-377.
- Atsumi S., W. Higashide and J. C. Liao (2009) Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde. *Nature Biotechnology* 27:1177-1180.
- Barz W., H. Herzbeck and W. Husemann (1980) Alkaloids and lipids of heterotrophic, photomixotrophic and photoautotrophic cell suspension cultures of *Peganum harmala*. *Planta Medica* 40:137-148.
- Beck E. and U. Renner (1989) Ammonium triggers uptake of NO₃⁻ by *Chenopodium rubrum* suspension culture cells and remobilization of their vacuolar nitrate pool. *Plant and Cell Physiology* 30:487-495.
- Bender L., A. Kumar and K. H. Neumann (1985) On the photosynthetic system and assimilate metabolism of *Daucus* and *Arachis* cell cultures. In: Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures. K. H. Neumann, W. Barz, E. Reingard (eds). Heidelberg Springer Verlag, Berlin, Germany. pp:24-42.
- Bergmann L. (1967) Growth of green suspension cultures of *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" with CO₂ as carbon source. *Planta* 74:243-249.
- Bhaskaran S. and R. H. Smith (1990) Regeneration in cereal tissue culture: a review. *Crop Science* 30:1328-1337.
- Bhaskaran S., R. H. Smith and R. J. Newton (1985) Physiological changes in cultured sorghum cells in response to induced water stress. I. Free proline. *Plant Physiology* 79:266-269.
- Blair L. C., C. J. Chastain and J. M. Widholm (1988) Initiation and characterization of a cotton (*Gossypium hirsutum* L.) photoautotrophic cell suspension culture. *Plant Cell Reports* 7:266-269.
- Bohnert H. J. and B. Shen (1999) Transformation and compatible solutes. *Scientia Horticulturae* 78:237-260.
- Bressan R. A., A. K. Handa, S. Handa and P. S. Hasegawa (1982) Growth and water relations of cultured tomato cells after adjustment to low external water potentials. *Plant Physiology* 70:1303-1309.
- Brouquisse R., P. Weigel, D. Rhodes, C. F. Yocum and A. D. Hanson (1989). Evidence for a ferredoxine-dependent choline monooxygenase from spinach chloroplast stroma. *Plant Physiology* 90:322-329.
- Campbell W. H., P. Ziegler and E. Beck (1984) Development of nitrogen assimilation enzymes during photoautotrophic growth of *Chenopodium rubrum* suspension cultures. *Plant Physiology* 74:947-950.
- Carlozzi P. (2008) Closed photobioreactor assessments to grow, intensively, light dependent microorganisms: a twenty-year Italian outdoor investigation. *The Open Biotechnology Journal* 2:63-72.
- Carriere F., G. Gil, P. Tapie and P. Chagvardieff (1989) Biotransformation of geraniol by photoautotrophic, photomixotrophic and heterotrophic plant cell suspensions. *Phytochemistry* 28:1087-1090.
- Cazalé A., M. Rouet-Mayer, H. Barbier-Brygoo, Y. Mathieu and C. Laurière (1998) Oxidative burst and hypoosmotic stress in tobacco cell suspensions. *Plant Physiology* 116:659-669.
- Chaumont D. and C. Guadin (1985) Transition from photomixotrophic to photoautotrophic growth of *Asparagus officinalis* in suspension culture. *Biomass* 8:41-58.
- Chisti Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25:294-306.

- Corduan G. (1970) Autotrophe gewebe-kulturen von *Ruta graveolens* und deren 14CO_2 markierungs-produkte. *Planta* 91:291-301.
- Dalton C. C. (1980) Photoautotrophy of spinach cells in continuous culture: photosynthetic development and sustained photoautotrophic growth. *Journal of Experimental Botany* 31:791-804.
- Desai S. H. and S. Atsumi (2013) Photosynthetic approaches to chemical biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 24:1031-1036.
- Dexter J. and P. C. Fu (2009) Metabolic engineering of cyanobacteria for ethanol production. *Energy and Environmental Science* 2:857-864.
- Ducat D. C. and P. A. Silver (2012) Improving carbon fixation pathways. *Current Opinion in Chemical Biology* 16:337-344.
- Ebel J. and A. Mithofer (1998) Early events in elicitation of plant defense. *Planta* 206:335-348.
- Fischer U., U. J. Santore, W. Hüsemann, W. Barz and A. W. Alfermann (1994) Semicontinuous cultivation of photoautotrophic cell suspension cultures in a 20 L airlift-reactor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 38:123-134.
- Fischer U. and W. Alfermann (1995) Cultivation of photoautotrophic plant cell suspensions in the bioreactor: influence of culture conditions. *Journal of Biotechnology* 41:19-28.
- Fuentes G., C. Talavera, Y. Desjardins and J. M. Santamaría (2006) Protocol to achieve photoautotrophic coconut plants cultured *in vitro* with improved performance *ex vitro*. In: *Methods in Molecular Biology*. V. M. Loyola-Vargas, F. Vasquez-Flota (eds). Humana Press. New Jersey, USA. pp:131-144.
- Gamborg O. L., R. A. Miller and O. Ojima (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cell. *Experimental Cell Research* 50:151-158.
- García-Valenzuela X., E. García-Moya, Q. Rascón-Cruz, L. Herrera-Estrella and G. A. Aguado-Santacruz (2005) Chlorophyll accumulation is enhanced by osmotic stress in graminaceous chlorophyll cells. *Journal of Plant Physiology* 162:650-661.
- Gao Q., W. Wang, H. Zhao and X. Lu (2012) Effects of fatty acid activation on photosynthetic production of fatty acid-based biofuels in *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biotechnology for Biofuels* 5:17.
- Genkov T., M. Meyer, H. Griffiths and R. J. Spreitzer (2010) Functional hybrid rubisco enzymes with plant small subunits and algal large subunits: engineered *rbcS* cDNA for expression in *Chlamydomonas*. *Journal of Biological Chemistry* 285:19833-19841.
- Goldstein C. S. and J. M. Widholm (1990) Photosynthetic characterization of photoautotrophic cells cultured in a minimal medium. *Plant Physiology* 94:1641-1646.
- Gray B. N., B. A. Ahner and M. R. Hanson (2009) High-level bacterial cellulase accumulation in chloroplast-transformed tobacco mediated by downstream box fusions. *Biotechnology and Bioengineering* 102:1045-1054.
- Günter E. A. and Y. S. Ovodov (2005) Effect of calcium, phosphate and nitrogen on cell growth and biosynthesis of cell wall polysaccharides by *Silene vulgaris* cell culture. *Journal of Biotechnology* 117:385-393.
- Hallenbeck P. C. (2012) The future of biofuels, biofuels of the future: In: *Microbial Technologies in Advanced Biofuels Production*. P. C. Hallenbeck (ed). Springer. U.S. pp:261-268.
- Hagimori M., T. Matsumoto and Y. Obi (1982) Studies on the production of *Digitalis* cardenolides by plant tissue culture. II. Effect of light and plant growth substances on digitoxin formation by undifferentiated cells and shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. grown in liquid media. *Plant Physiology* 69:653-656.
- Hampp C., A. Ritcher, S. Osorio, G. Zelling, A. K. Shina, A. Jammer, A. R. Fernie, B. Grimm and T. Roitsch (2012) Establishment of a photoautotrophic cell suspension culture of *Arabidopsis thaliana* for photosynthetic, metabolic, and signaling studies. *Molecular Plant* 5:524-527.
- Harun R. and M. Danquah (2010) Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. *Process Biochemistry* 46:304-309.
- Hawkins H. J. and S. H. Lips (1997) Cell suspension cultures of *Solanum tuberosum* L. as a model system for N and salinity response effect of salinity on NO_3^- uptake and PM-ATPase activity. *Journal of Plant Physiology* 150:103-109.
- Hayashi H. A., L. Mustardy, P. Deshniun, M. Ida and N. Murata (1997) Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxydase; accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. *Plant Journal* 12:133-142.
- Horn M. E., J. H. Sherrard and J. M. Widholm (1983) Photoautotrophic growth of soybean cells in suspension culture. *Plant Physiology* 72:426-429.
- Horn M. E. and J. M. Widholm (1994) Photoautotrophic growth of soybean cells in suspension culture. III. Characterization of carbon fixation products under high and low CO_2 levels. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 39: 239-244.
- Hüsemann W. (1981) Growth characteristics of hormone and vitamin independent photoautotrophic cell suspension cultures from *Chenopodium rubrum*. *Protoplasma* 109:415-431.
- Hüsemann W. (1982) Photoautotrophic growth of cell suspension cultures from *Chenopodium rubrum* in an airlift fermenter. *Protoplasma* 113:214-220.
- Hüsemann W. (1983) Continuous culture growth of photoautotrophic cell suspensions from *Chenopodium rubrum*. *Plant Cell Reports* 2:59-62.
- Hüsemann W., A. Plohr and W. Barz (1979) Photosynthetic characteristics of photomixotrophic and photoautotrophic cell suspension cultures of *Chenopodium rubrum*. *Protoplasma* 100:101-112.
- Hüsemann W., R. Callies and D. Leibfritz (1992) External pH modifies the intracellular pH and the mode of photosynthetic CO_2 assimilation in photoautotrophic cell suspension cultures of *Chenopodium rubrum* L. *Botanica Acta* 105:116-120.
- Hüsemann W. and W. Barz (1977) Photoautotrophic growth and photosynthesis in cell suspension cultures of *Chenopodium rubrum*. *Physiologia Plantarum* 40:77-81.
- Igbavboa U., H. J. Sieweke, E. Leistner, I. Rower, W. Hüsemann and W. Barz (1985) Alternative formation of anthraquinones and lipoquinones in heterotrophic and photoautotrophic cell suspension cultures of *Morinda lucida* Benth. *Planta* 166:537-544.
- Ikemeyer D. and W. Barz (1989) Comparison of secondary product accumulation in photoautotrophic, photomixotrophic and heterotrophic *Nicotiana tabacum* cell suspension cultures. *Plant Cell Reports* 8:479-482.
- John R. P., G. S. Anisha, K. M. Nampoothiri and A. Pandey (2011) Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. *Bioresource Technology* 102:186-193.
- Joyard J., E. Teyssier, C. Miège, D. Berny-Seigneurin, E. Maréchal, M. A. Block, A. Dorne, N. Rolland, G. Ajlani and R. Douce (1998) The biochemical machinery of plastid envelope membranes. *Plant Physiology* 118:715-723.
- Lan E. I. and J. C. Liao (2011) Metabolic engineering of cyanobacteria for 1-butanol production from carbon dioxide. *Metabolic Engineering* 13:353-363.
- Lange B. M., T. Rujan, W. Martin and R. Croteau (2000) Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:13172-13177.
- LaRosa P. C., P. M. Hasegawa and R. A. Bressan (1984) Photoautotrophic potato cells: transition from heterotrophic to autotrophic growth. *Physiologia Plantarum* 61:279-286.
- Lavergne D., A. Nato, J. M. Dupuis, M. Peán and P. Chagvardieff (1992) Evidence for the expression of morphological and biochemical characteristics of C3-photosynthesis in chlorophyllous callus cultures of *Zea mays*. *Physiologia Plantarum* 84:292-300.
- Lei A., H. Chen-H., G. Shen, Z. Hu, L. Chen and J. Wang (2012) Expression of fatty acid synthesis genes and fatty acid accumulation in *Haematococcus pluvialis* under different stressors. *Biotechnology for Biofuels* 5:18.
- Leleu O. and C. Vuylstekker (2004) Unusual regulatory nitrate reductase activity in cotyledons of *Brassica napus* seedlings: enhancement of nitrate reductase activity by ammonium supply. *Journal of Experimental Botany* 55:815-823.
- Leonardi A., S. Heimovaara-Dijkstra and M. Wang (1995) Differential involvement of abscisic acid in dehydration and osmotic stress in rice cell suspension. *Physiologia Plantarum* 93:31-37.
- Lerner H. R. (1985) Adaptation to salinity at the plant cell level. *Plant Soil* 89:3-14.
- Leelavathi S., N. Gupta, S. Maiti, A. Ghosh and V. Reddy (2003) Overproduction of an alkali- and thermo-stable xylanase in tobacco chloroplasts and efficient recovery of the enzyme. *Molecular Breeding* 11:59-67.

- Lindberg P., S. Park and A. Melis (2010) Engineering a platform for photosynthetic isoprene production in cyanobacteria, using *Synechocystis* as the model organism. *Metabolic Engineering* 12:70-79.
- Liu X. Y., S. Fallon, J. Sheng and R. Curtiss (2011) CO₂-limitation-inducible green recovery of fatty acids from cyanobacterial biomass. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America* 108:6905-6908.
- Linsmaier E. M. and F. Skoog (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 18:100-127.
- Marin E., L. Nussaume, A. Quesada, M. Gonneau, B. Sota, P. Hugueney, A. Frey and A. Marion-Poll (1996) Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO Journal* 15:2331-2342.
- McDonald K. A. and J. P. Jackman (1989) Bioreactor studies of growth and nutrient utilization in alfalfa suspension cultures. *Plant Cell Reports* 8:455-458.
- Mohanty B. and J. S. Fletcher (1978) Influence of ammonium on the growth and development of suspension cultures of Paul's scarlet rose. *Physiologia Plantarum* 42:221-225.
- Mohanty B. and J. S. Fletcher (1980) Ammonium influence on nitrogen assimilating enzymes and protein accumulation in suspension cultures of Paul's scarlet rose. *Physiologia Plantarum* 48:453-459.
- Mühlbach H. P. (1998) Use of plant cell cultures in biotechnology. *Annual Review of Biotechnology* 4:113-176.
- Murashige T. and F. A. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Nakamura H., M. Muramatsu, M. Hakata, O. Ueno, Y. Nagamura, H. Hirochika, M. Takano and H. Ichikawa (2009) Ectopic overexpression of the transcription factor *OsGLK1* induces chloroplast development in non-green rice cells. *Plant Cell Physiology* 11:1933-1949.
- Nagai T., C. Nakamura, T. Nagayoshi and H. Ono (1989) 2, 4-D-sustained photomixotrophic growth of a chlorophyllous cell suspension culture of *Nicotiana tabacum*. *Plant Cell Physiology* 30:17-23.
- Nitsch J. P. and C. Nitsch (1969) Haploid plants from pollen grains. *Science* 163:85-87.
- Noctor G. and C. H. Foyer (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49:249-279.
- Orthen B., M. Popp and W. Barz (2000) Cyclitol accumulation in suspended cells and intact plants of *Cicer arietinum* L. *Journal of Plant Physiology* 156:40-45.
- Paek K. Y., D. Chakrabarty and E. J. Hahn (2005) Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 3:287-300.
- Peel E. (1982) Photoautotrophic growth of suspension cultures of *Asparagus officinalis* L. cells in turbidostats. *Plant Science Letters* 24:147-155.
- Peters W., B. Fuchtbauer and E. Beck (1995) Nitrate reductase activity is endogenously induced by zeatin riboside in habituated suspension cultured *Chenopodium rubrum* cells. *Journal of Plant Physiology* 147:401-407.
- Pulz O. (2001) Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57:287-293.
- Ramachandra R. S. and G. A. Ravishankar (2002) Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 20:101-153.
- Rebeille F., P. Gans, P. Chagvardieff, M. Pean, P. Tapie and P. Thibault (1988) Mass spectrometric determination of the inorganic carbon species assimilated by photoautotrophic cells of *Euphorbia characias* L. *Journal of Biological Chemistry* 263:12373-12377.
- Reil G. and R. G. Berger (1996) Elicitation of volatile compounds in photomixotrophic cell culture of *Petroselinum crispum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 46:131-136.
- Rey P., F. Eymery, G. Peltier and A. Silvy (1989) Establishment and characterization of photoautotrophic protoplast-derived cultures of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Cell Reports* 8:234-237.
- Rhodes D. and A. D. Hanson (1993) Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44: 357-384.
- Robertson A. J., M. Ishikawa and L. V. Gusta (1995) The effect of prolonged abscisic acid treatment on the growth, in freezing tolerance and protein patterns of *Bromus inermis* (Leyss) cell suspensions cultured at either 3° or 25 °C. *Journal of Plant Physiology* 145:137-142.
- Robinson S. P. and G. P. Jones (1986) Accumulation of glycinebetaine in chloroplasts provides osmotic adjustment during salt stress. *Australian Journal of Plant Physiology* 13:659-668.
- Roitsch T. and A. K. Sinha (2002) Application of photoautotrophic suspension cultures in plant science. *Photosynthetica* 40:481-492.
- Sakamoto A., A. Murata and N. Murata (1998) Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycinebetaine and tolerance to salt and cold. *Plant Molecular Biology* 38:1011-1019.
- Sánchez-de-Jiménez E., M. Vargas, R. Aguilar and F. Jiménez (1988) Age-dependent responsiveness to cell differentiation stimulus in maize callus culture. *Plant Physiology and Biochemistry* 26:723-732.
- Savage D. F., B. Afonso, A. H. Chen and P. A. Silver (2010) Spatially ordered dynamics of the bacterial carbon fixation machinery. *Science* 327:1258-1261.
- Sato F. (2013) Characterization of plant functions using cultured plant cells, and biotechnological applications. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 1:1-9.
- Seo M. and T. Koshiba (2002) Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science* 7:41-48.
- Singh N. D. and H. Daniell (2010) Chloroplast genetic engineering: A novel technology for agricultural biotechnology and bio-pharmaceutical industry. In: The Chloroplast. C. A. Rebeiz, C. Benning, H. J. Bohnert, H. Daniell, J. K. Hooper, H. K. Lichtenthaler, A. Portis, B. C. Tripathy (eds). Springer. Dordrecht, The Netherlands. pp:263-284.
- Sivakumar G., J. Xu, R. W. Thompson, Y. Yang, P. Randol-Smith and P. J. Weathers (2012) Integrated green algal technology for bioremediation and biofuel. *Bioresource Technology* 107:1-9.
- Smetanska I. (2008) Production of secondary metabolites using plant cell cultures. In: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. U. Stahl, U. E. B. Donalies, E. Nevoigt (eds). Springer Berlin Heidelberg. Berlin. Germany. pp:187-228.
- Solis C., E. Sánchez-de-Jiménez, V. M. Loyola-Vargas, A. Cárabez and B. Lotina-Hennsen (1989) The biogenesis of chloroplasts in tissue cultures of a C3 and a C4 plant. *Plant Cell Physiology* 30:609-616.
- Stocker S., M. C. Guitton, A. Barth and H. P. Muhlbach (1993) Photosynthetically active suspension cultures of potato spindle tuber viroid infected tomato cells as tools for studying viroid-host cell interaction. *Plant Cell Reports* 12:597-602.
- Tan X. M., L. Yao, Q. Q. Gao, W. H. Wang, F. X. Qi and X. F. Lu (2011) Photosynthesis driven conversion of carbon dioxide to fatty alcohols and hydrocarbons in cyanobacteria. *Metabolic Engineering* 13:169-76.
- Taya M., M. Miya-Oka, Y. Toyo-Oka, M. Kino-Oka, S. Tone and K. On (1995) Growth characteristics of liverwort cells, *Marchantia paleacea* var. diptera, in a photoautotrophic suspension culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 80:580-585.
- Tholalakabavi A., J. J. Zwiazek and T. A. Thorpe (1994) Effect of mannitol and glucose induced osmotic stress on growth, water relations and solute composition of cell suspension cultures of poplar (*Populus deltoides* var. occidentalis) in relation to anthocyanin accumulation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 30:164-170.
- Tholalakabavi A., J. J. Zwiazek and T. A. Thorpe (1997) Osmotically-stressed poplar cell cultures: anthocyanin accumulation, deaminase activity, and solute composition. *Journal of Plant Physiology* 151:489-496.
- Treat W. J., J. Castillon and E. J. Soltes (1990) Photobioreactor culture of photosynthetic soybean cells. Growth and biomass characteristics. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 24/25:497-510.
- Tyler R. T., W. G. W. Kurz and B. D. Panchuk (1986) Photoautotrophic cell suspension cultures of periwinkle *Catharanthus roseus* (L.) G. Don: transition from heterotrophic to photoautotrophic growth. *Plant Cell Reports* 5:195-198.

- Umeda M., C. Hara, Y. Matsubayashi, H. Li, Q. Liu, F. Tadokoro, S. Aotsuka and H. Uchimiya (1994) Expressed sequence tags from cultured cells of rice (*Oryza sativa* L.) under stressed conditions: analysis of transcripts of genes engaged in ATP-generating pathways. *Plant Molecular Biology* 25:469-478.
- Vargas-Suarez M., A. Rincón-Guzman, C. Mujica-Jiménez, R. A. Muñoz-Clares and E. Sanchez-de-Jiménez (1996) Influence of carbon source and CO₂ enrichment on biochemical parameters associated with photomixotrophy in maize callus cultures. *Plant Physiology* 149:585-591.
- Verma D., A. Kanagaraj, S. Jin, N. D. Singh, P. E. Kolattukudy and H. Daniell (2010) Chloroplast-derived enzyme cocktails hydrolyse lignocellulosic biomass and release fermentable sugars. *Plant Biotechnology Journal* 8:332-350.
- Weigel P., E. A. Weretilnyk and A. D. Hanson (1986) Betaine aldehyde oxidation by spinach chloroplasts. *Plant Physiology* 82:753-759.
- Widholm J. M. (1992) Properties and uses of photoautotrophic plant cell cultures: In: International Review of Cytology. K. W. Jeon Friedlander (ed). Academic Press. San Diego, US. pp:109-175.
- Wink M. and T. Hartmann (1980) Production of quinolizidine alkaloids by photomixotrophic cell suspension cultures: biochemical and biogenetic aspects. *Planta Medica* 40:149-155.
- Wright K. M. and C. V. Givan (1988) Regulation of non-autotrophic carbon dioxide assimilation by ammonia in cultured cells of *Acer pseudoplatanus* L. *Plant Science* 58:151-158.
- Xu C., L. C. Blair and S. M. D. Rogers (1988) Characteristics of five new photoautotrophic suspension cultures including two *Amaranthus* species and a cotton strain growing on ambient CO₂ levels. *Plant Physiology* 88:1297-1302.
- Yamada Y. (1985) Photosynthetic potential of plant cell cultures: In: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. A. Fiechter (ed). Springer. Berlin/Heidelberg. pp:89-98.
- Yamada Y., K. Imaizumi-K., F. Sato and T. Yasuda (1981) Photoautotrophic and photomixotrophic culture of green tobacco cells in a jar-fermenter. *Plant and Cell Physiology* 22:917-922.
- Yamada Y. and F. Sato (1978) The photoautotrophic culture of chlorophyllous cells. *Plant and Cell Physiology* 19:691-699.
- Yu L. X., B. N. Gray, C. J. Rutzke, L. P. Walker, D. B. Wilson and M. R. Hanson (2007) Expression of thermostable microbial cellulases in the chloroplasts of nicotine-free tobacco. *Journal of Biotechnology* 131:362-369.
- Ziegler P. and R. Scheibe (1989) Greening and growth of suspension-cultured cells of *Chenopodium rubrum* under conditions of heterotrophic and autotrophic nutrition. *Plant, Cell and Environment* 12:725-735.