

Biorreactores de inmersión temporal para la propagación masiva de plantas

José Albarrán^{1*}

Efraín Salazar¹

Iselen Trujillo²

Ariadne Vegas¹

Adrian González¹

Andy Díaz¹

Elba Vallejo¹

Luis Castro¹

María Torrealba¹

Adriana Silva²

Las técnicas de propagación vegetativa forman parte de las prácticas agrícolas convencionales, sin embargo, no satisfacen la demanda de plantas requeridas para el autoabastecimiento de alimento en nuestro país, por la baja eficiencia de los métodos de propagación desarrollados. Esta situación ha justificado el diseño de metodologías de propagación *in vitro*, que ofrecen la ventaja de obtener un gran número de plantas en un tiempo y espacios relativamente cortos, al compararlas con las vías convencionales de propagación asexual, además que posibilita liberar de patógenos a los materiales regenerados (Ferreira *et al.*, 1998).

Es importante señalar, que las metodologías tradicionales de propagación *in vitro*, hasta la fecha tampoco han logrado satisfacer la demanda de plantas; normalmente requieren de medios de cultivo semisólidos gelificados, alto número de recipientes de cultivo, salas de crecimiento con numerosos estantes y mayor cantidad de personas dedicadas a la siembra y subcultivo de plantas en las diferentes fases de la micropropagación. Por lo tanto, esta tecnología se aplica sólo a aquellas especies que se propagan vegetativamente y que tienen un alto retorno económico; en el resto de los casos, los costos de producción de las vitroplantas es tan elevado que limita su uso comercial.

Una alternativa consiste en el desarrollo de tecnologías que permitan automatizar los procedimientos de micropropagación (proliferación, elongación y enraizamiento) que puedan ser aplicados a diferentes cultivos y que además favorezcan la aclimatización y endurecimiento de plantas en condiciones de umbráculo. De esta manera, se utiliza la tecnología de los biorreactores tradicionales pero modificados para la propagación masiva de plantas, diseñando diferentes tipos de recipientes

¹Investigadores. INIA-Ceniap. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Unidad de Biotecnología. Maracay, estado Aragua.

²Profesoras. IDECYT-CEDAT. Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez. El Cují, estado Miranda. *Correo electrónico: jgalbarran@inia.gov.ve

validados para numerosos cultivos y establecidos en diferentes países.

Entre los tipos de biorreactores, los de inmersión temporal se diseñaron basándose en el uso de medios de cultivo líquido y la automatización del proceso de micropropagación con la finalidad de aumentar las tasas de multiplicación de especies vegetales de interés agrícola, forestal y medicinal; de esta manera se obtiene un mayor número de plantas por recipiente, el reemplazo del medio de cultivo es sencillo y demanda poca mano de obra.

Dependiendo de la especie, el período de tiempo empleado para la regeneración de plantas utilizando biorreactores pueden ser relativamente corto y genera gran cantidad de plantas, lo cual influye drásticamente en la disminución de los costos de producción.

El efecto positivo de la inmersión temporal sobre la micropropagación se presenta en la proliferación de brotes, microestacas, microtuberización y embriogénesis somática de diferentes especies (Etienne y Berthouly, 2002). Esta tecnología se ha desarrollado exitosamente en diferentes países para la propagación de bananos (Alvard *et al.*, 1993; Escalant *et al.*, 1994), café (Berthouly y Etienne, 1999; Albarrán *et al.*, 2005), cítricos (Cabasson y *et al.*, 1997), caucho (Etienne *et al.*, 1997), papa (Teisson y Alvard, 1998), eucalipto (Castro y González, 2002) y piña (Escalona *et al.*, 1999).

En Venezuela, Colmenares y Giménez (2003) reportaron la utilización de sistemas de inmersión temporal para la propagación de bananos, obteniendo una tasa de multiplicación 3-4 veces mayores que el cultivo en medios semisólidos. En el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas INIA - Ceniap, se

está utilizando esta tecnología para la propagación masiva de piña, lechosa, banano y plátano.

En nuestro país, se justifica la aplicación de estas metodologías ya que, existe una alta demanda de material de siembra de buena calidad en diferentes rubros agrícolas para cultivar grandes superficies de terreno: frutales, raíces, tubérculos, cereales, caña de azúcar, café; que contribuyan a mejorar los rendimientos del cultivo para el consumo fresco o para el procesamiento industrial, bien sea a pequeña escala (conucos, parcelas y huertos familiares) o a gran escala con fines comerciales. En general, esta tecnología debe estar al servicio de las comunidades organizadas fundamentalmente para su desarrollo endógeno y contribuir a la seguridad alimentaria.

Biorreactores y su clasificación

Los biorreactores son recipientes que contienen medio de cultivo líquido, en el cual se sumergen células o tejidos que son usados para la producción industrial de microorganismos, metabolitos vegetales y animales (Takayama y Akita, 1994), implica el control automático y monitoreo de las condiciones del cultivo para obtener altos rendimientos, incrementar la productividad y disminuir los costos. Se pueden clasificar según su sistema de agitación, o el proceso de inmersión, los cuales pueden ser por agitación mecánica o neumáticos, y de acuerdo al proceso de inmersión: continua o temporal.

Según el sistema de agitación

Los biorreactores de agitación mecánica, son aquellos dispositivos agitados por propelas o aspas, generalmente hechos de acero inoxidable; que se utilizan para el cultivo de bacterias; son los llamados fermentadores. Los biorreactores neumáticos poseen un sistema de inyección de aire que puede ser de abajo hacia arriba formando pequeñas burbujas (contraflujo), o inyección radial, creando un vórtice. Por lo general, están fabricados de polímeros, fibras de vidrio, y en algunos casos de acero inoxidable.

Clasificación de acuerdo al sistema de inmersión

Biorreactores de inmersión continua, son aquellos donde el medio de cultivo está en contacto permanente con el material a propagar, por lo

general son utilizados para el cultivo de células, y bacterias (Takayama y Akita, 1994), fabricados en polímeros, vidrio y acero inoxidable. Pueden ser agitados mediante sistemas neumáticos o mecánicos. Además de ser útiles para la propagación de células, fermentación de cerveza, biolixiviación de minerales, producción de enzimas).

Para los cultivos celulares es muy importante la esterilidad, ya que, al contaminarse el contenido de un biorreactor se pierde todo el producto que se intenta obtener, otro factor de interés es la homogeneidad del cultivo proporcionado por el sistema mecánico de propelas que agita el medio en el interior del biorreactor (en el caso de los biorreactores de agitación mecánica). En un sistema aeróbico, además, debe existir un mecanismo de suministro de oxígeno para el crecimiento de las células.

El tamaño de los recipientes dependerá de la escala o volumen que se quiera producir. Este tipo de biorreactores ha sido utilizado tradicionalmente en el proceso de fermentación de la industria cervecera, de vinos y producción de enzimas. En el caso de producción de plantas con este tipo de sistemas, en el año 1994 se logró obtener 10.000 vástagos de *Stevia rebaudiana* en biorreactores de 500 litros (Akita *et al.*, 1994). Esta especie es muy importante para la producción de un edulcorante natural. También es útil para la producción comercial de insecticidas, saborizantes, colorantes, enzimas, herbicidas, entre otros.

Biorreactores de inmersión temporal, son recipientes que combinan aireación y medio de cultivo líquido, (Harris y Mason, 1983), su mecanismo se basa en proporcionar inmersión con un tiempo y frecuencia determinado que dependerá del cultivo que se propague. Están fabricados en polímeros o vidrio y son utilizados principalmente para la propagación masiva *in vitro* de plantas. Su agitación es neumática, aunque se pudiese agitar mecánicamente.

Algunas de las variables a controlar en este tipo de biorreactores son la duración y frecuencia de la inmersión, el volumen del medio de cultivo y del recipiente, así como la frecuencia de cambio del medio de cultivo. Cuando trabajamos con cultivos *in vitro* debemos hacer subcultivos mensual o bimestralmente, dependiendo del cultivo. Estos subcultivos se deben realizar para promover la propagación de crecimiento de las plantas.

Biorreactores utilizados en la propagación masiva *in vitro* de plantas

Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT), diseñado por el Centro de Bioplasmas en Cuba, consiste en dos recipientes: en uno se encuentra el medio de cultivo y en el otro tejido vegetal o la planta que está en crecimiento. Funciona con una bomba que permite el paso de aire a través del recipiente, donde se encuentra el medio de cultivo, la presión del aire empuja el medio hacia el otro recipiente donde están las células o la planta en crecimiento, obteniendo los nutrientes que necesita para crecer. Luego se corta el suministro de aire y otra bomba activa un mecanismo en este recipiente que hace que el medio de cultivo pase de nuevo al recipiente inicial y así se completa el ciclo de inmersión.

Sistema de inmersión temporal diseñado por la Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuarias (EMBRAPA), funciona bajo el mismo principio del anterior, utiliza dos tanques de almacenamiento, uno destinado para el medio de cultivo, y el otro para los explantes, una bomba de aire que funciona dualmente, es decir sirve para extraer el medio de cultivo y trasladarlo hasta el recipiente donde se encuentran los explantes, y posteriormente lo desaloja regresándolo al tanque inicial.

Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado (RITA®), es el más comercial de los sistemas de inmersión temporal. En lugar de tener dos recipientes como los modelos anteriores, poseen un recipiente dividido en dos compartimientos. Este sistema es accionado por la entrada a contraflujo de aire a tra-

vés de un ducto precedido de un filtro que impide el paso de bacterias y esporas de hongos, entrando a una presión específica de 0,2 bar, elevando el medio de cultivo desde el compartimiento inferior al compartimiento superior.

El medio de cultivo se mantiene en la parte superior sumergiendo el tejido por un tiempo determinado y luego cuando se interrumpe la entrada de aire, el medio baja por gravedad al compartimiento inferior. El exceso de aire sale por un filtro adicional, liberando la presión del sistema; y adicionalmente las células toman el oxígeno necesario para su crecimiento.

Una característica común en todos los biorreactores es que su velocidad de agitación deberá ser baja (menos de 150 revoluciones por minuto) y en flujo laminar constante (González, 2006), con el fin de no dañar el cultivo. El cambio del medio de cultivo es muy sencillo, y consiste en extraer el compartimiento interno con una pinza y trasladarlo a un recipiente donde se encuentra el medio de cultivo nuevo. Este proceso dura apenas unos cuantos segundos.

Para la instalación automatizada del sistema de inmersión temporal es importante el uso de un reloj temporizador digital que active y desactive en un tiempo específico y de manera independiente a través de una serie de electroválvulas, el aire proveniente de un compresor. De esta manera el aire circula a través de las tuberías que finalmente se conectan a los recipientes o biorreactores (Foto 1 a,b,c y d).

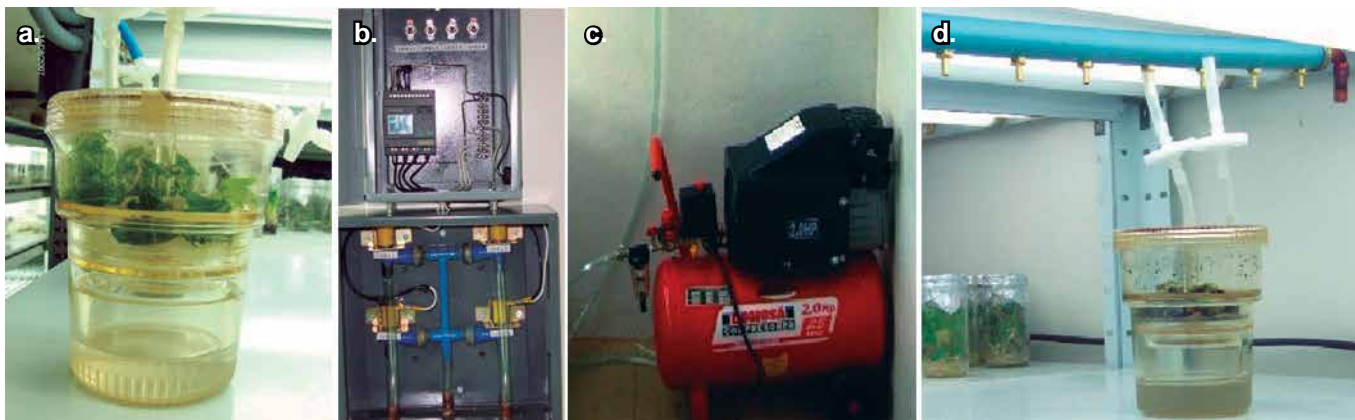


Foto 1 a, b, c y d. Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado (RITA);

- a.** RITA donde se observan los dos compartimientos, en el inferior se encuentra el medio de cultivo y en el superior el tejido vegetal; **b.** Temporizador, electroválvulas; **c.** compresor de aire; **d.** RITA conectado al sistema de inmersión temporal.

Etapas del proceso de propagación masiva

En la Figura, se puede observar un esquema del proceso de propagación masiva, el cual se divide en las siguientes etapas:

- Iniciación o establecimiento del cultivo:** el explante se siembra en un medio de cultivo semisólido para que ocurra la desdiferenciación y diferenciación de brotes.
- Multiplicación *in vitro*:** desarrollo y multiplicación de los vástagos o brotes en los biorreactores de inmersión temporal a partir de las células que se han involucrado inicialmente en el medio de cultivo semisólido. En esta etapa, además de cultivarse brotes en proliferación, se pueden utilizar también células en suspensión o embriones somáticos.
- Enraizamiento:** puede inducir en el biorreactor de inmersión temporal con el mismo medio de cultivo o cambiándolo a uno de composición química distinta; y en algunos casos, es necesario inducir el enraizamiento en un medio de cultivo semisólido.
- Aclimatización:** consiste en extraer las plantas del recipiente y colocarlas en materos o bolsas de vivero con un sustrato de siembra preferiblemente

estéril, con la temperatura y humedad relativa adecuada que permita el crecimiento normal de las vitroplantas.

Generalmente, las plantas propagadas en sistemas de inmersión temporal, no necesitan una etapa de aclimatización o es muy corta (Etienne y Berthouly, 2002), si se compara con los métodos de propagación en medios de cultivo semisólido, donde, a consecuencia de la falta de intercambio gaseoso entre el interior del recipiente y el exterior, la transición de la condición *in vitro* a *ex vitro*, es mayor para disminuir la tasa de mortalidad de las vitroplantas.

A partir de este proceso de propagación, se pueden multiplicar una gran cantidad de especies de interés alimenticio, medicinales, forestales, con buenos rendimientos utilizándose una combinación de medios de cultivos sólidos y líquidos. El sistema tradicional de propagación *in vitro* con medios de cultivo semisólidos, presenta algunas desventajas relacionadas con una mayor heterogeneidad del material propagado (brotes de diferentes tamaños en el mismo recipiente); muy poco intercambio gaseoso, lo cual afecta el crecimiento de las plantas; requiere una inversión inicial y mano de obra, que en muchos casos, representa entre el 40 y 60 % de los costos de producción.

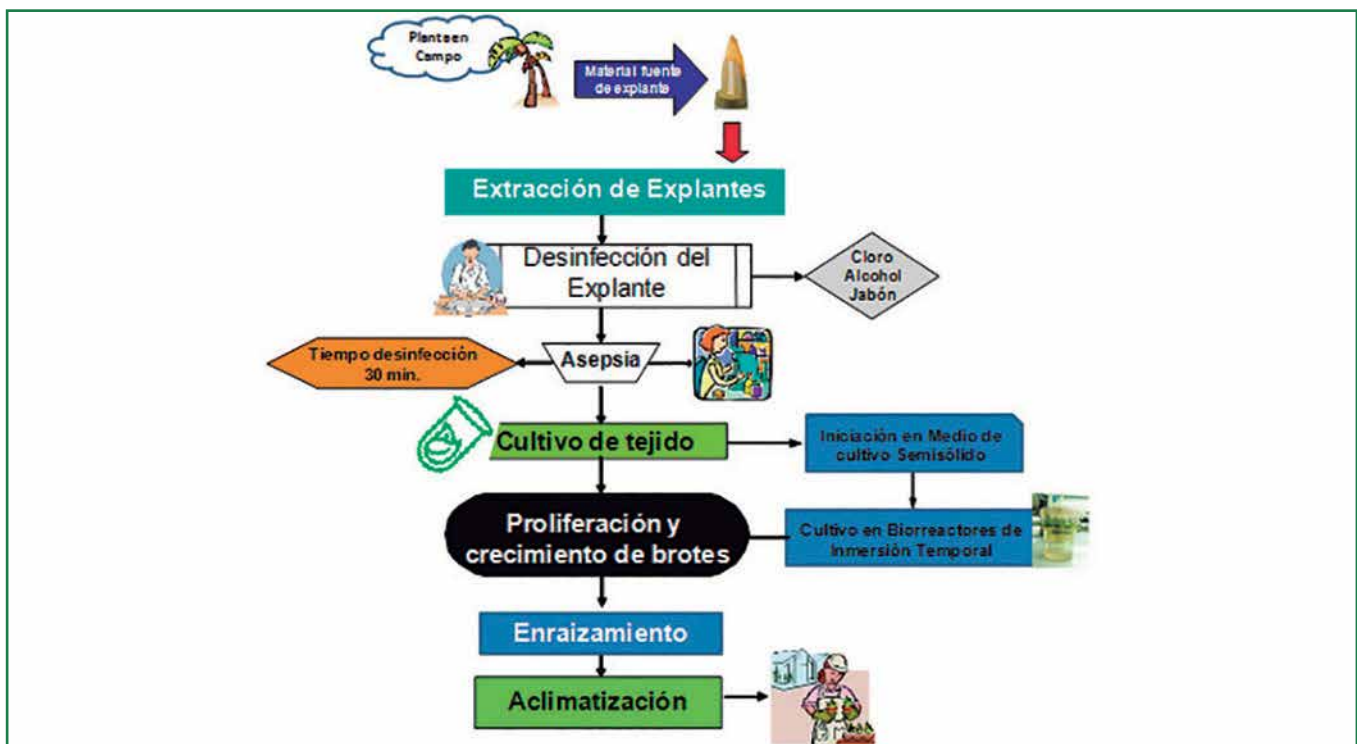


Figura. Proceso de cultivo de tejido *in vitro* en sistemas de inmersión temporal.

Ventajas y desventajas del sistema de inmersión temporal

- Cuando se propagan plantas utilizando medios de cultivo líquidos en sistemas de inmersión temporal los costos disminuyen, entre otros por evitar el uso de agentes gelificantes los cuales son costosos, los cambios de medio de cultivo son más sencillos requiriendo menor cantidad de mano de obra, las plantas son más uniformes, el mayor intercambio gaseoso estimula la tasa de crecimiento y de multiplicación, así como una aclimatización directa.
- Permite realizar estudios fisiológicos y bioquímicos del proceso de propagación, medición y control automatizado de parámetros importantes como: oxígeno, pH, iluminación, temperatura, dinámica de nutrientes, entre otros.
- En algunas especies puede ocurrir hiperhidricidad en los tejidos bajo condiciones de inmersión en medio de cultivo líquido, afectando su crecimiento. En estos casos, al sumergirse totalmente el tejido en el medio de cultivo líquido, la disponibilidad de oxígeno es mínima, las células se asfixian afectando sus funciones fisiológicas y bioquímicas.
- Pueden ocurrir grandes pérdidas de material vegetal por contaminación bacteriana o fúngica

como producto de la manipulación de los biorreactores de inmersión temporal, por tal motivo, se debe trabajar con la mayor asepsia posible.

- Como en el caso del sistema tradicional, el éxito de la micropropagación depende del genotipo de la especie, algunas son recalcitrantes independientemente del sistema de propagación empleado.

Propagación masiva de especies frutales en Venezuela haciendo uso de biorreactores de inmersión temporal

En el INIA, a través de un proyecto financiado por el Fondo de Consorcios de Innovación (FCI-INIA), se propagaron por sistemas de inmersión temporal tipo RITA: plátano cv. Hartón y banano cv. Pineo Gigante (Foto 2 a, b, c, d y e), lechosa var. Maradol (Foto 3 a, b, c y d) y piña var. Española Roja (Foto 4 a, b, c y d); por organogénesis en todos los cultivos, así como por embriogénesis somática en el caso de lechosa, con la finalidad de obtener plantas sanas y genéticamente uniformes que contribuyan con la oferta de plantas de calidad para la industria frutícola nacional. Esta tecnología puede ser transferida a productores organizados y ofrece un gran potencial de desarrollo agrícola en las principales zonas productivas del país.



Foto 2 a, b, c, d y e. Propagación masiva de banano Pineo Gigante en RITA, a partir del cultivo de ápices caulinares; **a.** Hijuelo de banano; **b y c.** Cormo reducido para extracción del ápice; **d.** Vitroplantas creciendo en RITA; **e.** Vitroplantas creciendo en condiciones de vivero.

INIA Divulga 28 mayo - agosto 2014



Foto 3 a, b, c y d. Propagación masiva de lechosa var. Maradol en RITA; a y b. Brotes de lechosa creciendo en RITA; c. Enraizamiento de brotes; d. Vitroplantas en aclimatación.

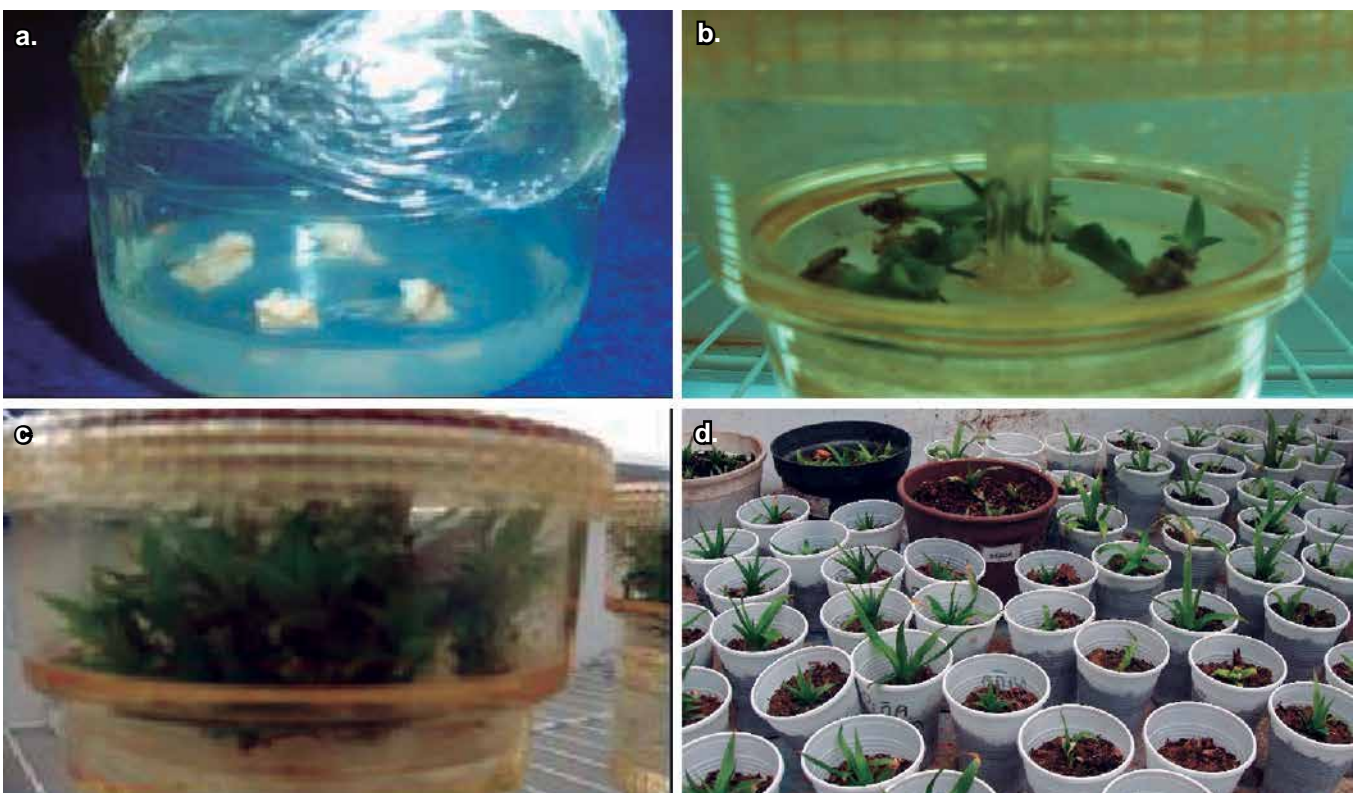


Foto 4 a, b, c y d. Propagación masiva de Piña var. Española Roja en RITA; a. Iniciación con yemas cultivadas en medio de cultivo semisólido; b. Cultivo de brotes en RITA; c. Proliferación y crecimiento de brotes; d. Vitroplantas aclimatizadas.

Consideraciones finales

La técnica de propagación masiva haciendo uso de biorreactores de inmersión temporal representa una alternativa eficiente para la producción de "semilla" de calidad para los agricultores del país, principalmente en aquellos rubros donde la oferta de plantas es baja mediante la aplicación de métodos tradicionales de propagación.

Entre los diferentes sistemas de inmersión temporal (RITA), es uno de los más comerciales y ampliamente difundido en el mundo. En Venezuela, ha sido utilizado con buenos resultados para la propagación de especies frutales: banano, plátano, lechosa y piña; cultivos importantes por su valor nutricional y demanda de consumo.

La transferencia de la tecnología a los productores agrícolas organizados, contribuirá al escalamiento de la producción de plantas, a mejorar los rendimientos del cultivo, disminuir los costos de producción, así como mejorar los ingresos y desarrollo endógeno de las comunidades involucradas.

Bibliografía consultada

- Akita, M., T. Shigeoka., Y. Koizumi and K. Kawamura, 1994. Mass propagation of shoots of *Stevia rebaudiana* using a large scale bioreactor. *Plant Cell Reports*. 13 (3-4): 180-183.
- Albarrán, J., B. Bertrand, M. Lartaud and H. Etienne, 2005. Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica* L.) somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81: 27-36.
- Alvard, D., F. Côte and C. Teisson, 1993. Comparison of methods of liquid medium culture of banana micropropagation. Effects of temporary immersion of explants. *Plant Cell Tissue Culture and Organ Culture*. 32: 55-60.
- Berthouly, M. and H. Etienne 1999. Somatic embryogenesis of coffee. In : Jain, S.; Gupta, P.; Newton, R. (Eds) *Somatic Embryogenesis in Woody plants*, vol. 5. pp 259-288. Kluwer Academic Publishers, Great Britain.
- Cabasson, C., D. Alvard, D. Dambier, P. Ollitrault and C. Teisson, 1997. Improvement of Citrus somatic embryo development by temporary immersion. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 50: 33-37.
- Castro, D. y J. González 2002. Micropropagación de eucalipto (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) en el sistema de inmersión temporal. *Agricultura Técnica (Chile)* 62 (1): 68-78.
- Escalant, J., C. Teisson and F. Côte 1994. Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*Musa* spp). *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 30P: 181-186.
- Escalona, M., J. Lorenzo, B. González, M. Daquinta, J. Gonzáles, Y. Desjardins and C. Borroto 1999. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports* 18 (9):743-748.
- Etienne, H. and M. Berthouly, 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 69 (3): 215-231.
- Etienne, H., M. Lartaud, N. Michaux-Ferriere, M. Carron, M. Berthouly, and C. Teisson, 1997. Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.) using the temporary immersion technique. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 33: 81-87.
- Ferreira, M., L. Caldas, E. Pereira, 1998. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. En: *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Antonio Torres; Linda Caldas; José Buso (eds). EMBRAPA. Brasília, DF. Pag. 21-43.
- González, A. 2006. Diseño y construcción de un biorreactor de inmersión temporal para la propagación *in vitro* de especies vegetales. Trabajo especial de grado. Escuela de Metalurgia y Ciencia de los Materiales. Facultad de Ingeniería. Universidad Central de Venezuela. Caracas. 100 p.
- Harris, R. and E. Manson, (1983). Two machines for in vitro propagation of plants in liquid médium. *Can. J. Plant Sci.* 63: 311-316.
- La Starza, S.; Gentile, A.; Monticelli, S.; Frantarelli, A. In "VITRO" Propagation of Temperate Fruit Plants by Temporary Immersion Techniques: Physiological Aspects. [En línea]. Instituto Sperimentale per la frutticoltura di Roma. Italia. [Consultado, 2009, abril 01]. Disponible en: www.inea.it/isf/cartella%20del%20WG/La%20Starza.htm
- Pinzón, A. 2007. Desarrollo e implementación de tecnologías en la propagación clonal de dos variedades de papaya (*Carica papaya* L.) para producción de semilla limpia a gran escala. Resúmenes de tesis de doctorado. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. *Universitas Scientiarum. Revista de la Facultad de Ciencias*. 12 (2): 147-151. Disponible en: http://www.javeriana.edu.co/universitas_scientiarum/universitas_docs/Vol_12%20No%202/14-RESUMENES.pdf.
- Takayama, S. and M. Akita 1994. The types of bioreactors used for shoots and embryos. *Plant Cell, Tissue and Culture*. 39: 147-156.
- Teisson, C. and D. Alvard, 1998. In vitro propagation of potato microtubers in liquid medium using temporary immersion. *Conf. Potato seed production by tissue culture*, Brussels, Cost 822, European Commission.