

# MICROPROPAGACIÓN DE PLANTAS EN BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL (BIT)



Alicia Castillo<sup>1</sup>, Richard Ashfield<sup>2</sup>, Marlene Bentancor<sup>1</sup>, Lucía Bentancor<sup>1</sup>, María Belén Bonilla<sup>1</sup>, Maribel Ceppa<sup>1</sup>, Richard Franco<sup>2</sup>, Natalia Silva<sup>1</sup>, Danilo Cabrera<sup>2</sup>, Pablo Rodríguez<sup>2</sup> y Roberto Zoppolo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Biotecnología

<sup>2</sup>Programa Nacional de Fruticultura

La multiplicación *in vitro* de plantas concebida en forma tradicional presenta una serie de características complejas, por ejemplo podemos citar la utilización de un gran número de envases donde se lleva a cabo el crecimiento de las plantas. Estos envases deben ser de material autoclavable, vidrio o polipropileno que permita su esterilización. Para el caso del vidrio, a nivel nacional hay una escasa oferta de recipientes útiles por su tamaño. En el caso de envases de polipropileno, la disponibilidad es menor aún, por lo que en ambos casos es frecuente tener que recurrir a envases importados. Otra característica de la técnica es que requiere gran cantidad de mano de obra para procesar el material vegetal que se denomina explante.

Estos deben ser transferidos en períodos regulares y su manipulación (selección, corte y trasplante) representa entre el 50-70% de los costos de producción de una

planta micropropagada. Aunque la manipulación es la principal parte del trabajo y la más técnica, sucede que la limpieza, llenado y manejo de un gran número de envases es engorrosa.

Para el crecimiento de los explantes en general se emplea un medio de cultivo sólido o semi-sólido, lo cual dificulta la automatización de procesos. Luego de las etapas de laboratorio (introducción, multiplicación y enraizamiento), se pasa a la fase final de aclimatación o adaptación de los explantes en el invernáculo. Dependiendo de las especies, durante la aclimatación puede haber grandes pérdidas por la falta de adaptación de las micro plantas al cambio de ambiente.

En esta etapa final, en las plantas deberán ocurrir una serie de cambios que permitirán continuar con su crecimiento en condiciones *ex vitro*. Como consecuencia de lo expresado, la aplicación desde el punto de vista comercial de la micropropagación, está limitada a cultivos que tengan un alto valor por unidad de planta obtenida al final del proceso.

Para viabilizar la micropropagación como actividad comercial, es importante disponer de tecnologías que automaticen estos procesos en alguna de sus fases y también ajustar protocolos de aclimatación eficientes.

Para alcanzar estos objetivos, se ha implementado la utilización del medio de cultivo líquido, usando contenedores especiales denominados biorreactores. El medio líquido presenta varias ventajas con respecto al sólido. Genera una mayor facilidad en la absorción de los nutrientes por los explantes, dada por la formación de una película acuosa de medio de cultivo que queda cubriendo el tejido vegetal en toda su superficie. En el medio sólido, la difusión de los nutrientes es a través del agar en un solo punto de contacto entre el explante y el medio de cultivo.

En los biorreactores, las condiciones de cultivo son más uniformes y el medio de cultivo puede ser fácilmente renovado sin cambio de envase. Además, el tiempo necesario para hacer la transferencia de los explantes es menor. Las ventajas en el uso de biorreactores incluyen un aumento en la tasa de multiplicación (número de plantas obtenidas por explante sembrado), rápido crecimiento de las plantas, reducción en los costos del medio de cultivo, reducción en el gasto de energía, disminución de la mano de obra empleada para la generación de plantas y menor necesidad del espacio. La eliminación del agar como agente solidificante reduce el costo de los medios de cultivo, debido a que es un insumo caro. En los biorreactores se colocan más plantas por unidad de superficie de cámara de crecimiento, lo que implica una reducción en espacio con una disminución en los requerimientos de energía para la iluminación y control de la temperatura ambiente.

**TIPOS DE BIORREACTORES**

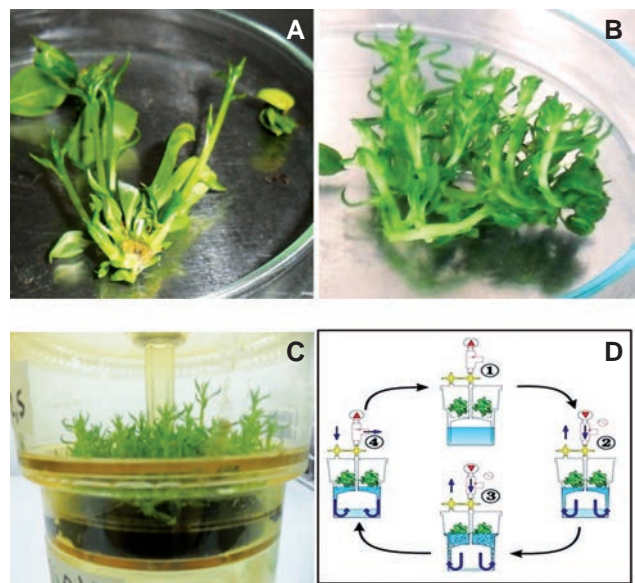
Los primeros biorreactores utilizados fueron de inmersión permanente, similares a los fermentadores utilizados para cultivos celulares. En este sistema los explantes están sumergidos en el medio de cultivo y reciben aireación y/o agitación para mejorar las condiciones de crecimiento. Dado que hay pocas especies vegetales capaces de adaptarse a crecer en condiciones de inundación, con baja presencia de oxígeno, en la mayoría de los casos los explantes se asfixian y sufren un trastorno fisiológico denominado hiperhidricidad o vitrificación. Los efectos visibles de la vitrificación se describen como una apariencia vítrea con brotes suculentos, color verde oscuro y un pobre sistema radicular.

La vitrificación es un desorden fisiológico complejo y multicausal que afecta a las plantas que crecen en medio líquido; ocurre por un exceso en la entrada de agua en las células que determina que las plantas adquieran un aspecto traslúcido como si fueran de vidrio. A nivel celular, la vitrificación induce una serie de cambios metabólicos y fisiológicos que afectan la capacidad de las plantas de sobrevivir luego del trasplante a causa del mal funcionamiento, sin respuesta a la actividad fotosintética y de la transpiración. También puede aparecer en medio sólido, cuando hay desbalance de nutrientes, escasa luminosidad, exceso de reguladores de crecimiento y medios de cultivo blandos.

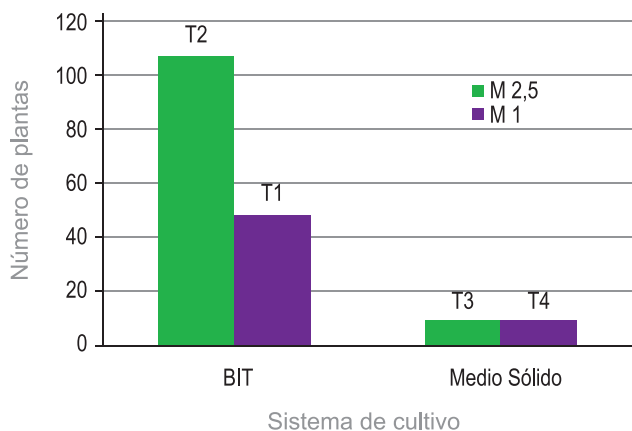
Una desventaja de los biorreactores es la mayor facilidad para el desarrollo de contaminación; esto conduce a incrementar las medidas que aseguren la asepsia en los cultivos. Para evitar la presencia de contaminación y poder extender el uso de los biorreactores, se han formulado compuestos comerciales con actividad biocida que inhiben el desarrollo de microorganismos en condiciones de cultivo en medio líquido.

Una variante de los biorreactores de inmersión permanente son los que incluyen el contacto intermitente entre el material vegetal y el medio de cultivo, con lo que se logra reducir la aparición de hiperhidricidad. Esta variante se define como el segundo prototipo de biorreactores, a los que se denomina BIT, biorreactores de inmersión temporal.

En los BIT, como su nombre lo indica, los explantes están en contacto con el medio de cultivo líquido en períodos sucesivos. Dicho medio se introduce al biorreactor por un tiempo definido y luego se retira. En este sistema el tiempo y la frecuencia de inmersión son las variables de ajuste, y representan los parámetros esenciales que se fijan según el medio de cultivo empleado y los requerimientos de la especie. Dentro de este sistema, los denominados RITA® (recipiente de inmersión temporal automático) fueron desarrollados por el CIRAD (Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement, Montpellier, Francia); tuvieron una gran difusión en los laboratorios de micropropagación. En los BIT, los intervalos de inmersión están regulados por un timer conectado a una bomba que impulsa el medio de cultivo. En la figura 1D, se representa la secuencia de operaciones del sistema BIT para el modelo RITA®.



**Figura 1** - Plantas de peral micropropagadas, A) en sistema convencional en medio sólido, B) mata obtenida del BIT, C) RITA® con plantas de peral D) esquema de las fases de funcionamiento de los RITA®.



**Figura 2** - Tasa de multiplicación de portainjerto para peral OHxF 40, obtenida en distintos medios de cultivo y en distintos sistemas de cultivo (biorreactores con medio líquido y medio sólido).

En la fase 1, el medio de cultivo se encuentra en la base del contenedor en estado estacionario; en la fase 2 la bomba se activa, ingresa aire y el medio de cultivo sube al compartimento de arriba donde están los explantes. La etapa de inmersión tiene una duración diferente dependiendo de la especie. Una vez que finaliza la fase de inmersión, la bomba corta el bombeo de medio y este desciende por gravedad. En la entrada y salida de aire, se colocan filtros de membrana de 0,2  $\mu\text{m}$  que aseguran la conservación de las condiciones de esterilidad en el sistema. En el laboratorio de cultivo de tejidos de la Unidad de Biotecnología se han llevado adelante diversas investigaciones relacionadas al crecimiento de varias especies en los sistemas BIT. Entre las especies evaluadas en condiciones de crecimiento en medio líquido citamos: arándanos, marcela, eucaliptus, portainjertos de manzanos y perales.

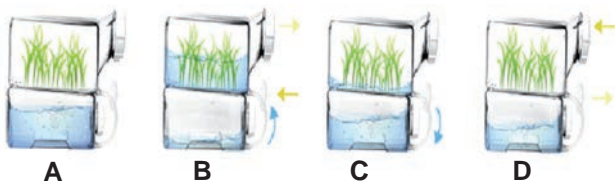
Como se muestra en la Figura 1, el número de plantas obtenido en el sistema convencional y en el medio líquido es diferente. En la Figura 1A, se muestra una mata de peral creciendo en medio sólido. Allí se observa el desarrollo de los brotes secundarios desde la base de la mata que está en contacto con el medio de cultivo. En cambio, en la Figura 1B se observa un desarrollo de mayor número de yemas secundarias a lo largo del explante inicial, que en medio líquido crece en forma horizontal sin efecto de la dominancia apical. La diferencia en el número de plantas obtenido se representa en la Figura 2; la gráfica muestra el número de explantes generados en medio sólido comparado con el número de plantas obtenido en los BIT. En ambos sistemas ocurre un cambio de la escala de producción de explantes; estos resultados corresponden a experimentos realizados con el portainjerto OHxF 40 para peral.

En el experimento se evaluó la tasa de multiplicación en dos medios de cultivo diferentes (un medio estándar M1 y otro medio enriquecido en sales minerales Mx2,5) y en dos situaciones de cultivo distintas: en medio sólido y el mismo medio de cultivo en inmersión temporal.

T1 y T4 representan un mismo medio de cultivo en los dos sistemas: medio sólido y medio líquido en BIT. En T2 y T3, se muestra el número de plantas generadas en otro medio de cultivo enriquecido en potasio, magnesio y calcio en dos veces y media respecto al medio control M1, en los sistemas sólido y líquido. En el medio Mx2,5 en el sistema BIT, el número de plantas aumentó 10 veces respecto al control en medio sólido. Sin embargo, el uso de los recipientes del tipo RITA se limitan a plantas con escaso desarrollo en altura y no es viable su aplicación a especies como la papa o la caña de azúcar que tienen un importante desarrollo en altura. Para poder aplicar el sistema en distintas especies vegetales se han diseñado distintos contenedores.

En la Figura 4 se muestra otro sistema de BIT, en el cual se utiliza un contenedor más versátil en relación al tamaño de los explantes que se pueden cultivar. Este sistema incluye otra variante que es la opción de aireación extra. El objetivo de la aireación es renovar la atmósfera del contenedor, para evitar la concentración de gases producidos por las propias plantas (principalmente etileno).





**Figura 3** - Esquema de funcionamiento de un biorreactor con aireación.

En la Figura 3 A) el sistema se encuentra en reposo, en 3 B) se inicia el ingreso de aire al compartimiento de abajo, que hace subir el medio de cultivo a la parte superior donde se encuentran los explantes; 3 C) se corta la bomba y el medio de cultivo vuelve al recinto inferior. En 3 D) ingresa aire a la parte superior del contenedor para oxigenar el sistema y se produce una renovación completa de la atmósfera.

Todas las condiciones de cultivo afectan la morfogénesis (generación de nuevos órganos) y dependiendo del sistema, cambian las características del explante obtenido. En la Figura 4 se muestra el mismo genotipo, un portainjerto para peral cultivado en dos sistemas BIT distintos, con aireación (4A) y sin aireación (4B); la diferencia en la calidad de planta es muy clara.

En nuestro laboratorio también se evaluó el sistema de BIT con aireación. Para optimizar el funcionamiento en este sistema, se utiliza un software que establece las frecuencias de llenado y vaciado del medio de cultivo, los tiempos de inmersión, la frecuencia y los tiempos de duración de la fase de aireación. Este último sistema supera los resultados que obtuvimos en el sistema BIT convencional. La inclusión de la fase de aireación ge-



**Figura 4** - Explantes obtenidos en BIT A) con suplemento de aireación, B) explantes obtenidos de los BIT convencionales sin aireación (RITA).

nera una constante renovación de la atmósfera dentro del contenedor donde crecen las plantas. Esto limita la posibilidad de asfixia y de estrés oxidativo; la aireación libera la presencia de etileno producido por las propias plantas.

El resto de los parámetros del sistema (medio de cultivo, tiempo y frecuencia de inmersión), no se modificaron y fueron iguales. Por lo tanto, nuestros resultados confirman que el sistema que incluye ventilación y intercambio de atmósfera, supera al sistema BIT clásico en relación a la calidad de los explantes producidos. Hay información disponible que reporta el aumento de eficiencia en la aclimatación cuando se mejora la calidad del explante. Este es un aspecto clave para avanzar en la aplicación de la micropropagación como actividad comercial.



**Figura 5** - A) planta de arándano multiplicada en medio sólido, B) planta de arándano multiplicada en BIT, C) plantas de arándano aclimatadas, D) plantas micropropagadas a campo.