

La propagación *in vitro* de plantas con Sistemas de Inmersión Temporal. Una Tecnología Apropriada para la agricultura sustentable

Rafael Muñiz¹
rmuniz53@gmail.com

¹Centro de Investigación y Desarrollo de Ingeniería (CIDI). Universidad Católica Andrés Bello. Caracas, Venezuela.

Historia del Artículo

Recibido 6 de Junio de 2018

Aceptado 19 de Julio de 2018

Disponible online: 19 de Julio de 2018

Resumen: En los últimos años la agricultura ha experimentado un profundo proceso de transformación que se ha reflejado en un nivel intenso de industrialización acompañada con la subsecuente incorporación de adelantos tecnológicos en los procesos productivos. Sin embargo, este proceso ha reflejado un carácter muy dispar al haber conducido también a una agricultura muy heterogénea. En particular para el caso de nuestros países en vías de desarrollo se plantea la necesidad de producir más alimentos con una alta calidad sin la disrupción del equilibrio de los ecosistemas, fortaleciendo el desarrollo territorial y local, generando nuevos puestos de trabajo, reduciendo así la migración masiva de la población rural a las zonas urbanas. Una tecnología apropiada y apropiable es aquella que la pueden aplicar con éxito los pequeños agricultores, promoviendo un mayor rendimiento de la tierra productiva e incrementando la productividad de los cultivos. Para poder lograr este propósito se requiere entre otras cosas implementar biotecnologías modernas que sean simples, eficientes, de bajo costo y replicables que permitan mejorar la calidad de los procesos productivos de los pequeños productores. La propagación *in vitro* de plantas por los métodos tradicionales satisface varios de estos requerimientos pero requiere de personal especializado, de laboratorios acondicionados a tales fines y de insumos costosos. La tecnología de Biorreactores denominada Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) es una opción viable que ofrece considerables ventajas para la propagación *in vitro* de plantas bajo el enfoque de las tecnologías apropiadas. El presente trabajo analiza algunos aspectos relevantes del diseño y la aplicación de los SIT en la biotecnología agrícola, material que servirá de insumo documental para el diseño y construcción de un SIT de bajo costo en los laboratorios de la Universidad Católica Andrés Bello.

Palabras Clave: Biotecnología Agrícola, Propagación *in vitro* de Plantas, Tecnologías Apropriadas, Biorreactores, Sistemas de Inmersión Temporal.

The *in vitro* propagation of plants with Temporary Immersion Systems. An Appropriate Technology for sustainable agriculture

Abstract: In recent years, agriculture has undergone a profound process of transformation that has been reflected in an intense level of industrialization accompanied by the subsequent incorporation of technological advances in production processes. However, this process has shown a very disparate character since it has also led to a very heterogeneous agriculture. Particularly in the case of our developing countries, there is a need to produce more food with a high quality without disrupting the balance of ecosystems, strengthening territorial and local development, generating new jobs, thus reducing migration massive from the rural population to urban areas. An appropriate and appropriable technology is one that can be applied successfully by small farmers, promoting a higher yield of productive land and increasing the productivity of crops. In order to achieve this purpose, among other things, it is required to implement modern biotechnologies that are simple, efficient, low cost and replicable to improve the quality of the productive processes of small producers. The *in vitro* propagation of plants by traditional methods satisfies several of these requirements but requires specialized personnel, laboratories conditioned for such purposes and expensive inputs. Bioreactor technology called Temporary Immersion Systems (TIS) is a viable option that offers considerable advantages

for the in vitro propagation of plants under the approach of appropriate technologies. This paper analyzes some relevant aspects of the design and application of the TIS in agricultural biotechnology, material that will serve as a documentary input for the design and construction of a low-cost TIS in the laboratories of the Andres Bello Catholic University.

Keywords: Agricultural Biotechnology, *in vitro* Propagation of Plants, Appropriate Technologies, Bioreactors, Temporary Immersion Systems.

I. INTRODUCCIÓN

“ Es algo sano y necesario volver la mirada a la tierra para contemplar sus bellezas y poder reconocerlas con asombro y humildad “.

Rachel Carson.

Precursora del movimiento ecologista. Frase tomada de su obra: Primavera Silenciosa (1962)

En un contexto global, los sistemas actuales de producción y distribución de alimentos no han logrado alimentar de una forma eficiente a la población del planeta . El número total de personas subnutridas en el planeta en 2010 se estimó en 925 millones, y en los países en desarrollo la prevalencia de la subnutrición supera al 16%. Cerca del 75% de las personas más gravemente afectadas por las deficiencias en la alimentación viven en zonas rurales y sus medios de subsistencia dependen directa o indirectamente de la agricultura.

Por otra parte se estima que la población de la tierra pasará de cerca de 7 millardos en 2010 a una cifra que va a sobrepasar los 9000 millones para el 2050, con estos valores demográficos la seguridad alimentaria mundial se verá amenazada sin tomar en cuenta los retos que plantea el cambio climático como veremos más adelante.[1]

El empleo de productos agrícolas en la producción de biocombustibles complica todavía más el panorama global. Se estima que para el próximo 2020, en los países industrializados se alcancen a consumir unos 150 kg per cápita anuales de maíz en forma de etanol, una cifra similar a los índices de consumo de cereales en los países en desarrollo sin tomar en cuenta en este balance la demanda en caña de azúcar en el hemisferio sur del planeta. [2]

Tales cambios en la demanda de los cultivos deben impulsar hacia un considerable incremento en la producción mundial de los cultivos destinados para la alimentación de las personas y de los animales a un nivel sin precedentes que se estima entre un 70% y 80%. [3]

En la mayoría de los países en desarrollo existe poco margen para ampliar las tierras cultivables. En América Latina la situación es diferente, aunque existen tierras disponibles, la mayoría de ellas están degradadas y/o sufren limitaciones relativas al tipo de suelo.

Por consiguiente para 2030 ese incremento del 80% necesario en la producción de alimentos tendrá que proceder de una intensificación agrícola que se traduzca en el aumento del rendimiento y de la intensidad del cultivo en la misma área disponible a través de prácticas sostenibles y sin duda no se podrá

continuar con las prácticas degradantes del monocultivo y el uso irracional de los insumos agrícolas.

En los próximos años la intensificación de la producción agrícola será necesaria de manera particular en zonas de producción marginales que son las que presentan condiciones productivas menos fiables, con menor calidad del suelo, menor acceso al agua y climas menos favorables.

Para enfrentar un desafío de magnitud global de esa naturaleza se requiere aplicar una estrategia de adaptación al cambio climático con escenarios variables de alteración de la temperatura, fuertes precipitaciones o sequías con la subsecuente incidencia de plagas, todos estos efectos determinarán qué cultivos se pueden y se deben producir y cuándo hacerlo, además de evaluar con atención cual sería su rendimiento potencial.

En el corto plazo se prevé que aumenten la variabilidad climática y los episodios meteorológicos extremos en todas las regiones del planeta lo que tendrá efectos nocivos en los rendimientos y en la calidad de las cosechas. Una tercera parte de las emisiones de gases de efecto invernadero proviene directa o indirectamente del sector agropecuario lo que supone un reto aun mayor para los sistemas convencionales que requieren una gran cantidad de recursos y contaminan el ambiente.[4]

Bajo este escenario de cambios climáticos los pequeños productores, quienes dependen en una gran medida de los bienes y servicios ecosistémicos para obtener los alimentos, el combustible y la fibra para sus familias y para su venta en los mercados locales serán los más vulnerables a la reducción de la calidad y la cantidad de los recursos naturales disponibles.

Dentro del sector agrícola en América Latina los pequeños productores que sustentan este tipo de agricultura representan hasta un 80% de la producción total de ese sector y absorben más del 60% del empleo.[5]

La intensificación sostenible del sector agrícola que propone la FAO se ha definido como el incremento de la producción a partir de la misma área de tierra al tiempo que se reducen los efectos negativos para el medio ambiente y se aumenta la contribución al capital natural y humano y al flujo de servicios.[6]

Parte del desafío consiste en implementar tecnologías simples que sean sostenibles incluyendo a las biotecnologías y también reforzando los programas de incentivos para la agricultura familiar, todo bajo el

cobijo del paraguas de una legislación justa y de políticas agrarias de vanguardia.

El Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB) define la biotecnología como:

« toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para crear o modificar productos o procesos para usos específicos ». [7]

Las biotecnologías agrícolas en un sentido amplio, incluyen tanto los conocimientos tradicionales y locales, prácticas orgánicas y agroecológicas, mejoramiento genético, aplicación del cultivo de tejidos y de técnicas genómicas.

Una biotecnología agrícola que sea apropiada y apropiable implica el diseño y la implementación de herramientas que contribuyan al desarrollo sostenible y además cumplan con otros requisitos: ser técnicamente factibles dentro del nivel de desarrollo técnico-científico de un país; proveer beneficios tangibles a los destinatarios; ser ambientalmente seguras, y social, económicamente y culturalmente aceptables.

Sin embargo, para que su inserción como biotecnologías agrícolas apropiadas y apropiables se adapte a las condiciones de producción y a la realidad socioeconómica y cultural de la región, se deben superar un conjunto de obstáculos científicos y tecnológicos, legales y regulatorios, que impiden muchas veces la eficiente y equitativa utilización de estos productos y servicios.

II. LA TECNOLOGÍA DE PROPAGACIÓN *in vitro* DE PLANTAS

La biotecnología se utiliza para resolver problemas en todos los aspectos de la producción agrícola: para elevar y estabilizar el rendimiento de los cultivos, mejorar la resistencia a las plagas, a condiciones abióticas adversas como la sequía y el frío, y aumentar el contenido nutricional de los alimentos. Se utiliza también, con el fin de crear material de propagación sano y de bajo costo y está proporcionando nuevos instrumentos para el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades de las plantas y para la conservación de los recursos genéticos y su modificación mediante los procesos de transgénesis. [8]

La propagación *in vitro* es una de las aplicaciones más extendidas hoy en día para la producción masiva de plantas, esta técnica consiste en regenerar las plantas partiendo de explantes o propágulos que proceden de diversas fuentes de material vegetal y que se cultivan en medios nutritivos apropiados, como fuente de material para la propagación se pueden utilizar: ápices de raíces o de tallos, embriones, ovarios, óvulos, anteras y polen entre otros. [9]

Los explantes crecen en un ambiente artificial controlado dentro de recipientes de vidrio o de plástico que permitan aplicar algún tipo de esterilización. Esta forma de cultivar las plantas tiene dos características que son fundamentales: la asepsia que mantiene el material libre de patógenos durante su periodo de

crecimiento, en el que es más sensible a la contaminación y la posibilidad de controlar cierto número de factores que afectan el crecimiento de las plántulas.

El fundamento de estas técnicas se basa en la teoría de la totipotencia celular. Esta teoría sostiene que existe la posibilidad de obtener una planta entera a partir de cualquier célula viva si se ajustan de forma conveniente las condiciones químicas, físicas y microbiológicas del cultivo.

Un primer paso que se debe cumplir en los procedimientos de propagación *in vitro* es modificar los medios de cultivo para lograr la pérdida de la diferenciación del tejido que se utiliza inicialmente como fuente de material para la propagación (explante). En una etapa posterior se busca la inducción de una nueva diferenciación de estas células de partida, lo que produce variadas respuestas morfológicas y fisiológicas en el material vegetal.

El cultivo *in vitro* de un órgano o de un fragmento de un órgano, con el objeto de lograr su reproducción vegetativa, se desarrolla siguiendo una estrategia constituida por varias etapas: la iniciación del cultivo en condiciones *in vitro*, la multiplicación activa de las estructuras capaces de desarrollarse como individuos idénticos a la planta donante y el paso de la heterotrofia a la autotrofia, con la consiguiente adaptación de las plántulas obtenidas a las condiciones de cultivo *in vivo*. Es en la etapa de multiplicación de la propagación *in vitro*, (denominada micropropagación) donde es necesario enfocar la atención para poder implementar alternativas que favorezcan la eficiencia de todo el proceso. [10]

El cultivo *in vitro* de plantas es una técnica que exige un control específico del medio ambiente del cultivo, tanto en sus aspectos físicos como químicos. Las plantas continuamente responden a una serie de estímulos externos e internos que cambian su fisiología y su morfología.

Entre los factores que se deben tomar en cuenta se encuentran: la intensidad y calidad de la luz que reciben los explantes, la concentración de los nutrientes minerales de los compuestos orgánicos y de los reguladores del crecimiento vegetal del medio nutritivo, la cantidad del agua que se aplica y la frecuencia con que se riegan, las características del material que les sirve de soporte a los explantes, que con frecuencia es el agar un gel que se obtiene a partir de algas, además se debe controlar la temperatura del cultivo, el pH del medio nutritivo y los niveles de gases que se producen y se consumen en el sistema tales como CO₂, O₂ y el etileno (C₂H₄), un hidrocarburo gaseoso que actúa como hormona vegetal. [11]

Reproducir en condiciones de laboratorio todos los factores que conforman el ambiente natural de la planta es algo demasiado complejo y por esa razón hay que conformarse con una simplificación aproximada a la realidad de las condiciones naturales de crecimiento seleccionando aquellos factores que se puedan mantener controlados.

Esta técnica posee un gran potencial comercial debido a la velocidad de propagación, la alta calidad de plantas que se obtienen por lo que ha permitido propagar miles de plantas sin necesidad de tener que disponer de semillas o de depender de un limitado número de brotes para la propagación vegetativa. El progreso que se ha podido lograr con este tipo de biotécnicas aporta un gran avance en los estudios bioquímicos, fisiológicos y moleculares.

En base al conocimiento adquirido hasta ahora con el cultivo de tejidos vegetales, acoplado a su vez con las técnicas de la ingeniería genética permiten obtener clones de plantas de difícil propagación vegetativa o que poseen características de interés particular o variedades de las cuales sólo existen pocos individuos y permiten a su vez obtener plantas transformadas con nuevas características genéticas de importancia en la agricultura actual. En adición el cultivo *in vitro* ofrece otro tipo de ventajas: el crecimiento es continuo a lo largo del año sin hacer diferenciación por las estaciones climáticas al crecer en cuartos controlados, y se requiere de menos espacio y mantenimiento para la propagación que en los métodos tradicionales. [12]

Sin embargo, igual que sucede con otros tipos de tecnologías, la propagación *in vitro* adolece de algunas limitaciones tales como: es más costosa que los métodos tradicionales de producción de plantas, requiere de un personal capacitado y de instalaciones especiales y los reactivos para los medios de cultivo y otros insumos son difíciles de conseguir en países en vías de desarrollo y son costosos.

Debido a estas limitaciones se han venido probando desde la década de los 60 y 70 como una alternativa al sistema de propagación tradicional el uso de un tipo de Biorreactores denominados Sistemas de Inmersión Temporal (SIT). [13]

III. LOS SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL

La expectativa de poder disponer de otro tipo de sistemas que demuestren una mayor eficiencia para la propagación de plantas *in vitro* superando a los sistemas convencionales que se describen en la sección anterior ha planteado la necesidad de implementar otro tipo de tecnologías con el propósito de aumentar la eficiencia y la reproducibilidad en los resultados y a su vez disminuir los costos.

Uno de los desarrollos que han resultado ser más prometedores en ese sentido es el uso de Biorreactores para el cultivo de tejidos vegetales, con especial atención en una variante de estos dispositivos que se conoce como Sistemas de Inmersión Temporal (SIT).

Un Biorreactor es un sistema de cultivo usualmente automatizado cuya principal función es proveer al cultivo de un ambiente controlado para lograr las condiciones óptimas para el crecimiento celular y para la producción de subproductos de interés comercial provenientes del cultivo.

Los Biorreactores presentan considerables ventajas sobre los recipientes normales que se emplean para el cultivo tradicional de células vegetales, ya que ofrecen la posibilidad de poder controlar mejor las

condiciones ambientales del cultivo y facilitan el escalamiento del proceso.

La primera vez que se hizo crecer células vegetales en reactores, fue en 1960 usando varios diseños comerciales y no comerciales adaptados a partir de sistemas de cultivo de células animales. [14]

El desempeño de cualquier Biorreactor depende de varios parámetros que contemplan los siguientes aspectos: se debe mantener una concentración elevada de la biomasa y las células deben permanecer uniformemente distribuidas en todo el volumen del cultivo a fin de prevenir la sedimentación o la flotación y de esta forma asegurar también una distribución uniforme de los nutrientes en el reactor aplicando una agitación que sea efectiva; se requiere mantener condiciones de asepsia; un control preciso de la temperatura del sistema y se debe suministrar oxígeno (aire) a un nivel que sea adecuado para asegurar el incremento de la biomasa. [15]

Estos dispositivos presentan también algunas desventajas uno de los problemas que con mayor frecuencia se presenta en los cultivos *in vitro* con Biorreactores (en particular con el tipo de inmersión permanente) es el fenómeno de la hiperhidricidad conocido también como vitrificación, este es un proceso degenerativo que daña a los explantes por asfixia y que se asocia con la permanencia por un tiempo demasiado prolongado del material vegetal en el medio de cultivo otros dos problemas frecuentes son la variación en el tamaño de las plántulas y la pérdida de material vegetal debido a la contaminación. [16]

Los SIT son sistemas de cultivo periódicos semiautomatizados o totalmente automatizados, basados en ciclos alternados de inmersión temporal del tejido vegetal cultivado en el medio líquido, seguido de drenaje y exposición del tejido de la planta a un entorno gaseoso.

Los SIT aportan una serie de características que son benéficas: en comparación con otros tipos de Biorreactores al evitar la inmersión continua del material vegetal en el medio de cultivo, este tipo de sistemas proveen una adecuada transferencia de oxígeno, facilitan los cambios secuenciales y automatizados del medio de cultivo, reducen la contaminación microbiana y tienen un costo menor a la de otros reactores convencionales. [17]

Por otra parte se ha señalado que la Inmersión Temporal reduce algunos de los problemas que se presentan en los cultivos de inmersión permanente con un medio de cultivo líquido estático, como: la escasa supervivencia y la pobre calidad de los propágulos, reduce la vitrificación, permite un intercambio bidireccional de las plantas con el medioambiente renovando los gases dentro del frasco de cultivo favoreciendo el crecimiento y el desarrollo de los propágulos. [18]

La clave del éxito con los SIT está muchas veces en establecer los tiempos de inmersión y la frecuencia requerida para cada especie. Este sistema es útil en cuanto previene la falta de oxígeno en el medio,

controla el ambiente gaseoso con cada inmersión y facilita la renovación de medio. [19]

Se plantea, además, que en este tipo de sistema de cultivo las condiciones de renovación periódica de la atmósfera interna del recipiente de cultivo logran en las plantas cultivadas una mejor relación entre la fotosíntesis y la transpiración, lo cual permite una mayor asimilación de nutrientes del medio de cultivo para su crecimiento

La estrategia de adaptación de las plantas a las condiciones de los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) se desarrolla por una combinación de características morfológicas, bioquímicas y fisiológicas que permiten un uso más eficaz de los recursos del medio interno en el recipiente de cultivo.

Este tipo de sistemas reduce los costos de la propagación in vitro hasta en un 20% en comparación con otros sistemas de cultivo líquido y hasta en un 46% con respecto al medio semisólido, esto una vez que se han hecho las inversiones iniciales en la compra de los equipos correspondientes. [20]

Las labores de mano de obra se reducen también, lo mismo que el espacio al permitir la propagación masiva, y se aumentan los rendimientos y la calidad del material. Además, de acuerdo con numerosos estudios, un gran número de especies tropicales muestran un mejor crecimiento y desarrollo en las etapas siguientes del proceso de aclimatación en las condiciones de campo cuando se propagan mediante los SIT. [21]

IV. VARIANTES DE SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL

Existen diversos diseños de Biorreactores que se han aplicado con éxito para el cultivo de plantas in vitro, y se les suele clasificar en base a dos criterios: generales, según su sistema de agitación que puede ser de tipo mecánico o neumático y también de acuerdo al tipo de proceso de inmersión que puede ser permanente o de inmersión temporal (o transitoria) en la cual los explantes permanecen en contacto con el medio nutritivo solo durante unos minutos por día en base a un programa de ciclos siguiendo una determinada frecuencia. [22]

Los Sistemas de Inmersión Temporal de uso más frecuente en la propagación in vitro de plantas se ubican dentro de cuatro modelos que se diferencian según su principio de operación:

A. *Sistemas de balancín*

Los sistemas de balancín utilizan una plataforma conectada a un dispositivo mecánico para inclinar en un ángulo dado una serie de recipientes donde se propagan los cultivos, de modo que el medio se pueda transferir de un extremo del envase de cultivo al otro y viceversa.

En general los recipientes están hechos de policarbonato transparente autoclavable y tienen forma de rectángulo con una abertura de boca ancha en la parte superior del envase, cerrada por un tapón de rosca con un de filtro en su interior para evitar la contaminación.

Después de la inoculación, los envases se colocan en bastidores y se agitan mecánicamente. Las inclinaciones de la plataforma crean pequeños frentes de onda y alternativamente sumergen y airean los propágulos cultivados. [23]

La principal ventaja del sistema de balancines es que se pueden acomodar grandes cantidades de envases de cultivo en un solo dispositivo y no es necesaria una conexión adicional a una línea aérea y con el resto del sistema de control que implica el uso de estos tipos de dispositivos.

Las limitaciones de los sistemas de balancines se relacionan con la necesidad de construir una plataforma basculante impulsada electromecánicamente lo que puede aumentar los costos de inversión y de energía a menos que se simplifique su diseño y se empleen materiales de bajo costo enfocando dicho diseño dentro del esquema de las tecnologías apropiadas que mencionamos antes en la introducción del artículo.

Las plataformas basculantes requieren más espacio para funcionar correctamente y esto se puede reflejar en el costo de producción por unidad de espacio en la cámara de crecimiento, sin embargo existe la alternativa de mantener los cultivos bajo luz solar natural que supera en intensidad y en calidad a la luz artificial fluorescente de las cámaras de crecimiento. Si los envases de cultivo no permiten una buena renovación del aire, y no se dispone de otras opciones para su ventilación forzada se debe considerar el reemplazo del medio nutritivo con una cierta frecuencia.

B. *Sistema de frascos gemelos*

El sistema de frascos gemelos es uno de los primeros SIT desarrollados. [24]. Básicamente, el sistema consta de dos contenedores (frascos o botellas de boca ancha), que están conectados entre sí por un tubo en forma de U invertida de vidrio o de plástico y tubos de silicona. Uno de los dos contenedores cumple la función de servir como cámara de cultivo, mientras que el otro contenedor se usa como un tanque de almacenamiento del medio nutritivo.

Cada contenedor está conectado a su propia línea de aire presurizado, controlada por dos relojes temporizadores independientes, intercaladas se colocan válvulas solenoides de tres vías.

Aunque en general, son fáciles de operar y pueden mantener la esterilidad durante largos períodos de cultivo entre sus limitaciones se encuentran la automatización que se requiere en este tipo de sistema, (la necesidad de dos relojes con temporizador y válvulas de solenoide, compresor y filtros de membrana).

C. *Sistemas de reflujos*

Los sistemas de reflujos se pueden considerar como una modificación simplificada de los sistemas de frascos gemelos. El sistema consta de dos recipientes: un recipiente superior que funciona como cámara de cultivo donde los explantes de la planta se colocan sobre un soporte de goma espuma, el segundo recipiente sirve como tanque de almacenamiento del

medio nutritivo y se coloca debajo del recipiente de cultivo.

Los dos recipientes están interconectados por puertos externos. Un soporte de goma espuma ayuda a mantener la humedad (entre un 85-90%) durante el período de exposición (no inmersión) y cumple también con la función de actuar como un rociador de aire durante la fase de inmersión. [25]

Las ventajas de los sistemas de reflujo son su construcción simple y confiable, la automatización simplificada y un menor gasto de energía. La distribución de luz no uniforme dentro del recipiente de cultivo y la falta de opciones para la ventilación forzada se encuentran entre las principales desventajas del sistema.

D. Reactor de Inmersión Temporal Automático (RITA)

El sistema RITA fue desarrollado por el CIRAD de Francia y se utiliza con mucha frecuencia para el cultivo intensivo de plantas *in vitro*.

El sistema consiste en un único recipiente de 500 ml fabricado de material plástico autoclavable con dos compartimentos, separados por una bandeja instalada con un soporte de malla y un tubo de plástico, colocado en su centro. [26]

El recipiente se cierra con una tapa de rosca que a su vez viene, equipada con puertos externos centrales y laterales en la parte superior. Los puertos de acceso laterales están aislados del entorno por filtros de membrana y el puerto central se está conectado a una línea de aire comprimido controlada por un reloj temporizador y una válvula solenoide de tres vías.

El compartimento superior del recipiente es la cámara de cultivo, mientras que el compartimento inferior es el tanque de almacenamiento medio. Las ventajas de RITA son la operación simple y confiable, el espacio compacto para el alojamiento de los aparatos y el mantener un nivel de humedad relativa adecuado con separación completa de los propágulos y el medio líquido.

Todos los elementos internos están conectados entre sí y se pueden manipular como una sola pieza lo que facilita el manejo de este dispositivo en comparación con otros sistemas como los frascos gemelos o los sistemas de reflujo en que se basa su principio de operación. Las principales desventajas de los sistemas son la incapacidad para la renovación del medio nutritivo y la falta de opciones para la ventilación forzada y el enriquecimiento de CO₂ en caso de que este sea requerido en alguna aplicación.

V. ALGUNOS PARÁMETROS A CONSIDERAR PARA EL DISEÑO DE UN SIT

Las condiciones de cultivo en los SIT pueden afectar el crecimiento de las plantas *in vitro* y su estado fisiológico, a través de cambios en el medio ambiente durante todo el período de cultivo.

Para lograr el crecimiento o multiplicación eficiente de los tejidos en los SIT es necesario controlar al menos

tres aspectos fundamentales a) determinar la duración y frecuencia apropiadas de las inmersiones, con lo cual se variarían las condiciones de cultivo dentro del recipiente: b) el suministro adecuado de nutrientes y c) la atmósfera gaseosa que rodea a los explantes. [27]

Además se debe considerar que los SIT no utilizan dispositivos de agitación mecánica como se aplica con frecuencia en otros tipos de Biorreactores, por lo que la dislocación de los propágulos cultivados, si los hay, se realiza únicamente por el poder de las fuerzas hidrodinámicas durante los períodos de inmersión.

Bajo estas condiciones, los tejidos de las plantas cultivadas experimentan una tensión de corte mínima que preserva la integridad del cultivo y mejora adicionalmente la morfología y la fisiología de los órganos.

Los otros parámetros que afectan la eficacia de los Sistemas de Inmersión Temporal son: la combinación entre una ventilación eficiente de los tejidos de la planta y el contacto intermitente entre toda la superficie del tejido y el medio líquido, el volumen del medio y cantidad de medio. [28]

A. El tiempo y la frecuencia de inmersión

En la propagación de plantas mediante el uso de Biorreactores de Inmersión Temporal, el tiempo y la frecuencia de inmersión son dos parámetros decisivos para lograr la eficiencia del sistema.

El contacto intermitente del medio nutritivo con los explantes proporciona una capa delgada de medio que se adhiere en toda la superficie del explante por cohesión y se renueva con cada inmersión. además dichos parámetros se encuentran relacionados tanto en la asimilación de los nutrientes por los explantes, como en la renovación de la atmósfera dentro del recipiente de cultivo evitando la acumulación de gases perjudiciales como el etileno, que promueve la senescencia de los tejidos, así se facilita la regulación de la concentración de CO₂ y se mejora la oxigenación de los tejidos, ajustando los tiempos y frecuencias inmersión se puede eliminar o controlar la hiperhidricidad, que afecta gravemente a los cultivos en medio líquido. [29]

Por lo general, el período de inmersión es corto de unos minutos, mientras que el período de exposición al aire se prolonga por varias horas. El ajuste preciso de las duraciones de los períodos de inmersión y exposición puede reducir significativamente la asfisia del tejido vegetal al crear las condiciones para un suministro óptimo de humedad y nutrientes con un mínimo contacto con el líquido.

B. El volumen del medio de cultivo

Optimizar el volumen de medio de cultivo y del recipiente mejora sustancialmente la eficacia, por una parte los cultivos producen sustancias químicas extracelulares que estimulan la formación de brotes y estas se diluyen cuando se utilizan grandes volúmenes de medio. Pero por otra parte un volumen adecuado de medio nos permite garantizar la cantidad adecuada de nutrientes, evita las pérdidas debido al consumo de los explantes y la evapotranspiración y facilita la

dilución de productos tóxicos o inhibidores de procesos favorables o no a la morfogénesis. [30]

C. *Las dimensiones del recipiente para el cultivo in vitro*

En general para todos los Sistemas de Inmersión Temporal, el volumen del frasco es mayor que el de los recipientes utilizados en los procedimientos convencionales de propagación in vitro con medio semisólido.

Este parámetro influye significativamente en los SIT ya que a mayor capacidad del frasco de cultivo, aumenta el volumen gaseoso por explante; siendo esta una medida de la densidad de inóculo que se requiere para realizar el escalado del sistema. No obstante bajo este contexto, el uso de contenedores más grandes significa que se utilizarán mayores volúmenes de medio de cultivo, lo que puede tener un efecto positivo o negativo sobre el material vegetal en la proliferación y en el crecimiento en base a lo que se plantea en el párrafo anterior. [31]

D. *El sistema de aireación*

La exposición directa del tejido vegetal al ambiente gaseoso simplifica significativamente el transporte de oxígeno entre las células cultivadas, en contraste con el cultivo totalmente sumergido, donde el transporte de oxígeno presenta resistencia en la interfase entre las zonas límite entre gas-líquido y líquido - sólido. El transporte más eficiente del oxígeno contribuye a mejorar el intercambio de gases lo que conduce a una menor incidencia de trastornos fisiológicos como la asfixia. [32]

La inmersión temporal ha demostrado claramente ser un sistema de cultivo de tejidos vegetales más eficiente que otros sistemas que no proveen de suficiente oxígeno al cultivo.

El ambiente interior de un recipiente de cultivo de tejidos es diferente del ambiente circundante exterior, dependiendo de los tejidos dentro del recipiente y el fotoperíodo la concentración de CO₂ será más alta o más baja, a diferencia de las concentraciones de etileno y humedad relativa que son altas, principalmente debido a los efectos combinados de evaporación continua del medio de cultivo y la transpiración de las hojas, las plantas obtenidas bajo las condiciones antes descritas, pueden presentar alteraciones en su estructura anatómica, morfológica y fisiológica. [33]

La aireación forzada se utiliza para inyectar el aire desde el exterior al interior de los recipientes de cultivo y viceversa, es uno de los métodos más eficaces para la mejorar la ventilación y el principio básico es crear una presión positiva dentro del recipiente, que conduce a la renovación completa de la atmósfera

Con este sistema, la composición gaseosa (CO₂) y el vapor de agua o cualquier otro gas puede ser controlado mediante el uso de una válvula, un controlador de flujo y un compresor de aire. La humedad relativa que resulta de la ventilación forzada puede estimular la transpiración de las plantas, lo que a su vez permite una mejor y menos prolongada

adaptación de las plantas a las condiciones ex vitro en las siguientes etapas de la propagación.

Este efecto se debe a que al aumentar el nivel de CO₂ y conjuntamente suprimir los azúcares del medio, la planta se verá forzada a fotosintetizar y a iniciar una serie de eventos fisiológicos como la apertura y cierre estomático. [34]

La mayoría de los sistemas comerciales que se encuentran a disposición en el mercado se basan en los modelos de tipo neumático, estos dispositivos han demostrado operar con muy buenos resultados y trabajan acoplados a sistemas automáticos de control, sin embargo en general este tipo de sistemas son costosos, al menos para los pequeños productores y no son muy fáciles de fabricar, en particular en los países en vías de desarrollo.

En adición a los requerimientos técnicos también se requiere de un cierto nivel de preparación por parte del personal que los opera, todos estos elementos que mencionamos alejan a muchos de estos sistemas comerciales del ideal que se busca con las tecnologías apropiadas y apropiables que ya mencionamos antes en este artículo.

VI. CONSIDERACIONES FINALES

En este contexto global en que nos encontramos actualmente que se ha caracterizado por aspirar a la meta del crecimiento continuo por mantener un ritmo acelerado y con frecuencia a veces no bien planificado, el efecto del aumento en el precio de los alimentos por una parte y los impactos del cambio climático por otra, han llevado a que los países comiencen a revalorizar dentro de sus políticas el papel que desempeñan los pequeños agricultores como un sector estratégico para la seguridad alimentaria.

En ese contexto la promoción de las biotecnologías simples como una herramienta de innovación jugará un rol fundamental para dar un impulso a la nueva agricultura.

Sin embargo para que la aplicación de las técnicas biotecnológicas no resulte en actividades aisladas con poca relevancia y se logre la aceptación por parte de los pequeños productores del sector agrícola, es necesario enmarcar dichas tecnologías en el concepto de una biotecnología apropiable y apropiada para que pueda beneficiarlos en cuanto a sus requerimientos, capacidades, prioridades y limitaciones.

El desarrollo de programas de investigación orientados al diseño, adaptación y puesta en marcha de las tecnologías apropiadas es un campo que se viene desarrollando con fuerza desde mediados del pasado siglo y que cada vez aporta un mayor número de soluciones viables a los problemas de los sectores menos favorecidos de nuestras sociedades y en particular en el sector rural.

A partir de los propósitos y objetivos coincidentes entre la academia y los agricultores han surgido en el pasado soluciones muy prometedoras por sus aplicaciones prácticas en términos de su simplicidad, eficiencia y eficacia. Confiamos que entre las humildes

contribuciones que pueda aportar este artículo se encuentre la de estimular en especial a los jóvenes ingenieros a dirigir su curiosidad y su talento hacia el descubrimiento y el desarrollo de las tecnologías apropiadas, un campo plagado de ingenio palabra que ha servido de fuente generatriz a esa disciplina del conocimiento.

VII. REFERENCIAS

- [1] FAO.(2011). Ahorrar para crecer. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/014/i2215s/i2215s.pdf>
- [2] FAO. (2010). El estado de la inseguridad alimentaria en el mundo: La inseguridad alimentaria en crisis prolongadas. Roma. . Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/013/i1683s/i1683s.pdf>
- [3] Izquierdo, J y de la Riva, G.(2000). Plant biotechnology and food security in Latin America and the Caribbean. EJB Electronic Journal of Biotechnology, 3 (1) April
- [4] Naciones Unidas. (2009) World urbanization prospects, the 2009 revision population database. Disponible en: <http://esa.un.org/wup2009/unup/>
- [5] Rosegrant, M., Ringler, C. y Msangi, S.(2008). International model for policy analysis of agricultural commodities and trade (IMPACT): Model description. Washington, DC, IFPRI.
- [6] Bruinsma, J.(2009). The resource outlook to 2050: By how much do land, water and crop yields need to increase by 2050? Documento presentado en el Foro de Expertos de Alto Nivel de la FAO sobre cómo alimentar al mundo en 2050, 24–26 Roma, FAO
- [7] Convenio sobre la Diversidad Biológica.(1992). Disponible en: <https://www.cbd.int/doc/legal/cbd-es.pdf>
- [8] Sharry, S; Adema, M y Abedini, W. (2015) Plantas de probeta. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de la Plata (Argentina). Fundación REDBIO Internacional
- [9] Garcia-Gonzalez, R., Quiroz, K., Carrasco, B. y Caligari, P. (2010), Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges. *Cienc. Inv. Agr. vol.37, n.3, pp. 5-30.*
- [10] Ahloowalia, B., y Savangikar, V. (2004) Incorporation of low cost options. In: International Atomic Energy Agency. Low cost options for tissue culture technology in developing countries. Viena, pags.: 41-45. *Proceedings of a Technical Meeting. FAO/IAEA.*
- [11] Oviedo de Cristaldo, R. (2014) . Micropropagación. En: Conjunto de estudios de caso sobre Biotecnologías simples, sostenibles y de bajo costo para la agricultura familiar. Citado en la referencia [8].
- [12] Roberts S., Shuler M. (1997). Large-scale plant cell culture. *Curr Opin Biotechnol* 8: 154–159
- [13] Debnath, S., (2011) Bioreactors and molecular analysis in berry crop micropropagation—a review. *Can. J. Plant Sci.* , 91, 147– 157.
- [14] Gautheret, R. (1983). Plant tissue culture: a history. *Bot. Mag. Tokyo* 96: 393-410
- [15] Paek, K. , Chakrabarty D. , Hahn E. (2005). Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 81:287-300
- [16] Steingroewer, J., Bley, T., Georgiev, V., Ivanov, I. et al.,(2013) Bioprocessing of differentiated plant in vitro systems. *Eng. Life Sci.* 13, 26–38.
- [17] Etienne, H., Berthouly, M. (2002), Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 69, 215–231.
- [18] Watt, M. (2012) The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. *Afr. J. Biotechnol.* 11, 14025–14035.
- [19] Lyam, P. , Musa, M. L., Jamaledine, Z. , Okere, U. et al. (2012), The potential of temporary immersion bioreactors (TIBs) in meeting crop production demand in Nigeria. *J. Biol. Life Sci.* 3, 66–86.
- [20] Albarran, J., Bertrand, B., Lartaud, M., Etienne, H.(2005) Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica*) somatic embryos. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 81, 27–36.
- [21] Escalona, M., Lorenzo, J., Gonzalez, B., Daquinta, M. et al. (1999). Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Rep.* 18, 743–748.
- [22] Weathers, P., Liu, C., Towler, M., Wyslouzil, B. (2008) Mist reactors: Principles, comparison of various systems, and case studies. *Electron. J. Integr. Biosci.* 3, 29–37.
- [23] Kamarainen-Karppinen, T., Virtanen, E., Rokka, V., Pirttila, A. (2010) , Novel bioreactor technology for mass propagation of potato microtubers. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 101, 245–249.
- [24] Liu, L., Li, S., Yu, K., Tang, H. et al. (2010), Rapid propagation of virus free sugarcane plantlets via temporary immersion bioreactor system. *Agric. Sci. Technol. Hunan* 11, 148–150
- [25] Cuello, J. , Yue, L. (2008), Ebb-and-Flow bioreactor regime and electrical elicitation: novel strategies for hairy root biochemical production. *Electron. J. Integr. Biosci.* 3, 45–56.
- [26] Mordocco, A., Brumbley, J., Lakshmanan, P. (2009), Development of a temporary immersion system (RITA) for mass production of sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* , 45, 450–457
- [27] Etienne, H., Berthouly, M.,(2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 69, 215–231.
- [28] Ducos, J. P., Terrier, B., Courtois, D., Petiard, V . (2008) Improvement of plastic-based disposable bioreactors for plant science needs. *Phytochem. Rev.* 7, 607–613.
- [29] Ashraf, M. , Aziz, M. , Stanslas, J., Kadir, M. (2013), Optimization of immersion frequency and medium substitution on microtuberization of *Chlorophytum borivilianum* in RITA system on production of saponins. *Process Biochem.* 48, 73–77
- [30] Albarran, J., Bertrand, B., Lartaud, M., Etienne, H.(2005), Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica*) somatic embryos. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 81, 27–36.
- [31] Adelberg, J., Toler, J. (2004) , Comparison of agar and an agitated, thin-film, liquid system for micropropagation of ornamental elephant ears. *HortScience*, 39, 1088–1092
- [32] Watt, M. (2012), The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. *Afr. J. Biotechnol.* 11, 14025–14035.
- [33] Eibl, R., Eibl, D. (2008), Design of bioreactors suitable for plant cell and tissue cultures. *Phytochem. Rev.* 7, 593–598.
- [34] Eibl, R., Werner, S., Eibl, D (2009)., Disposable bioreactors for plant liquid cultures at Litre-scale. *Eng. Life Sci.* 9, 156–164.