

Capítulo 2

Propagación de plantas en biorreactores de inmersión temporal

Lucia Isabel Chávez Ortiz
Mitzy Estefanía Rodríguez Ortega
*Departamento de Química del Centro de Ciencias Básicas
Universidad Autónoma de Aguascalientes*

Resumen

El uso de medios de cultivo líquidos y biorreactores para el cultivo de tejidos vegetales tiene varias ventajas sobre el uso de medios semisólidos, y se puede obtener una mayor cantidad de biomasa o de brotes reduciendo los costos de producción, ya que los agentes gelificantes son el componente más costoso del medio de cultivo. Sin embargo, también conlleva algunas dificultades, como el aumento en la frecuencia de hiperhidratación de los tejidos y el efecto cizalla. Estos inconvenientes se reducen significativamente con el uso de biorreactores de inmersión temporal (BIT), cuyo uso disminuye el estrés mecánico y permite la completa renovación de la atmósfera al interior del recipiente de cultivo. Previo a la micropropagación de una especie vegetal en biorreactores, se debe contar con un eficiente

protocolo de propagación *in vitro* en medio semisólido que permita conocer el tipo y concentración de reguladores de crecimiento vegetal (RCV) óptimos para la especie estudiada, y después se implementan las mismas condiciones en los biorreactores, omitiendo el uso de agentes gelificantes. Se efectuó la micropropagación de *Hetheroteca inuloides* y *Ruta chalepensis* en biorreactores de inmersión temporal de tipo tanques gemelos; en ambas especies se logró un incremento en la generación de brotes.

Cultivo de tejidos vegetales en medios líquidos

En general, para el cultivo de tejidos vegetales se emplean medios de cultivo semisólidos; sin embargo, desde hace varias décadas se comenzó a explorar el uso de medios de cultivo líquidos, debido a las ventajas que suponen respecto al uso de medios semisólidos, entre ellas:

1. Permiten que el explante tenga una mayor superficie de contacto con el medio de cultivo, con lo que se logra un incremento en la disponibilidad de nutrientes y reguladores de crecimiento vegetal.
2. Las sustancias exudadas por el propio explante, que en ocasiones tienen efectos inhibitorios e incluso deletéreos en los tejidos vegetales, se diluyen en el medio líquido, reduciendo su efecto negativo.
3. Hay una reducción importante en los costos de producción, puesto que se prescinde del uso de gelificantes, los cuales son el componente más costoso de los medios de cultivo semisólidos.
4. Permiten una regulación más precisa de factores físicos y químicos, son susceptibles de ser automatizados y pueden escalarse con relativa facilidad.

Aunque se han empleado medios líquidos en recipientes de cultivo estándar sin agitación, en la mayoría de los casos se requiere el uso de biorreactores, que según Mamun *et al.* (2015) se pueden describir simplemente como “sistemas cerrados, estériles para la propagación clonal de propágulos organogénicos o embriones somáticos”. Así pues, un biorreactor puede ser desde un simple recipiente de vidrio o plástico en agitación, hasta diseños muy complejos, con componentes más sofisticados.

Biorreactores de inmersión permanente

Se han diseñado distintos tipos de biorreactores de inmersión permanente, en los que los explantes se encuentran inmersos en el medio líquido todo el tiempo. Los biorreactores deben contar con mecanismos de agitación y aireación para el adecuado desarrollo de los tejidos vegetales, ya que una tasa adecuada de oxigenación generalmente promueve un aumento en la tasa de acumulación de biomasa; también se ha observado que una agitación adecuada brinda uniformidad en las condiciones de cultivo, con lo que se reduce el fenómeno de dominancia apical, aumentando la tasa de brotación de yemas. Algunos biorreactores de inmersión permanente tienen dispositivos de agitación mecánica (tanques de aireación y tanques de tambor rotatorio, por ejemplo) y otros, agitación neumática (como los de columna de burbujas y *airlift*). Estos sistemas han sido empleados principalmente para el cultivo de células vegetales desdiferenciadas, pero también se han utilizado para micropropagar algunas especies. Los principales inconvenientes de estos biorreactores son:

- a) el efecto cizalla, que puede causar daños considerables a los tejidos vegetales, especialmente a las estructuras más delicadas, como los meristemos, lo que los hace poco recomendables para el cultivo de tejidos organizados y plantas completas,
- b) que la mayoría de las especies vegetales de interés para el cultivo de tejidos vegetales son terrestres, y permanecer en condiciones de inmersión les resulta dañino.

En los sistemas de inmersión permanente es frecuente que se presenten desordenes morfológicos y fisiológicos serios; el más común es la hiperhidratación de los explantes y brotes. Las plantas hiperhidratadas tienen una apariencia vítrea, ya que sus tejidos están hinchados, translúcidos y deformes como resultado de una reducción en el contenido de clorofila y a la desorganización, incluso desaparición, de los cloroplastos. También se presenta hipolignificación, reducción de la capa cérica de la cutícula y hay cambios significativos en la actividad enzimática. Este fenómeno se puede atribuir al estrés oxidativo que sufren los tejidos debido a la inmersión permanente en el medio líquido; como resultado, se presenta un incremento en la concentración de especies reactivas de oxígeno, como peróxido de hidrógeno y radicales

superóxido e hidroxilo, a los que se atribuyen daños a las membranas celulares, degradación de proteínas, inactivación de enzimas y daños al ADN.

Biorreactores de inmersión temporal

Como alternativa ante la alta incidencia de la hiperhidratación debido a la inmersión permanente, se planteó la inmersión de los explantes en el medio líquido de manera intermitente. Además de ello, el uso de sistemas de inmersión temporal permite la completa renovación de la atmósfera dentro del recipiente de cultivo y disminuye el estrés mecánico en comparación a otros tipos de biorreactores.

En muchos sistemas de inmersión temporal el medio líquido se encuentra en un recipiente distinto al que contiene a los explantes, o bien, en un compartimiento distinto dentro del mismo recipiente de cultivo; el medio es bombeado de un recipiente o compartimiento a otro por medios neumáticos. Considerando que la disponibilidad de oxígeno en medios líquidos depende tanto de la concentración de oxígeno en la atmósfera interna del recipiente, como del oxígeno disuelto en el propio medio, los sistemas de bombeo del medio líquido de los biorreactores de inmersión temporal provocan una renovación total de la atmósfera del recipiente de cultivo, lo que impide que se presente una depleción de oxígeno y favorecen su disolución en el medio de cultivo.

Sistema de tanques gemelos

El biorreactor idóneo debería tener un diseño muy simple, con pocas aperturas para reducir el problema de la contaminación, y tener un bajo costo. Se han diseñado varios sistemas de inmersión temporal; particularmente, el sistema de tanques gemelos reportado por Escalona *et al.* (1999) tiene un diseño simple que resuelve de manera eficiente todos los aspectos cruciales en el diseño de un sistema de inmersión temporal; además puede ser construido a un costo muy bajo y permite un control total sobre las frecuencias y tiempos de inmersión.

Este sistema consta de dos recipientes de cultivo conectados entre sí mediante una manguera; el primer recipiente es el reservorio que contiene al medio de cultivo líquido, y el segundo recipiente contiene a los explantes.

El líquido se mueve del primer al segundo recipiente al bombear aire a través de un filtro hidrofóbico; el retorno del medio líquido del recipiente con los explantes al reservorio se realiza del mismo modo.

El sistema de tanques gemelos puede adecuarse a las necesidades y a los recursos disponibles, ya que puede construirse con materiales sencillos, de bajo costo y fáciles de conseguir; o si se cuenta con más recursos, se pueden emplear dispositivos más sofisticados para automatizar el sistema y controlar parámetros físicos:

- Se pueden emplear frascos de vidrio o recipientes de plástico de diferentes capacidades para contener al medio y a los explantes, dependiendo de los requerimientos de experimentación o producción.
- Para inyectar aire y transferir el medio líquido de un recipiente a otro se pueden utilizar pequeñas bombas de pecera para proveer la aireación de uno a tres biorreactores; o bien, compresores de aire para alimentar un gran número de sistemas, empleando electroválvulas para controlar el flujo de aire y las frecuencias de inmersión en distintos biorreactores.
- Para el control de los tiempos y frecuencias de inmersión se pueden emplear temporizadores digitales sencillos; o microcontroladores programados y controlados desde una computadora personal o desde una tableta digital.

Estableciendo un protocolo de micropropagación en sistemas de inmersión temporal

Antes de implementar un protocolo de micropropagación de una especie vegetal en biorreactores, se debe desarrollar un protocolo de micropropagación en medio semisólido para determinar las mejores condiciones de cultivo para lograr la propagación masiva *in vitro*; una vez que se conozcan el medio de cultivo apropiado, así como el tipo y concentración de reguladores de crecimiento vegetal adecuados, estas condiciones se replican en los biorreactores de inmersión temporal; en otras palabras, se emplea una composición idéntica del medio de cultivo, excepto que no se le agrega gelificante. De este modo la única variable que se introduce de manera inicial es el uso de los biorreactores y del medio líquido, y se podrá observar en un primer momento si con el siste-

ma de inmersión temporal se consiguen resultados similares en comparación al medio semisólido.

Como ya se ha señalado, el tiempo y frecuencia de inmersión son parámetros fundamentales que varían entre especies (Tabla 2.1), y pudieran estar relacionados con los requerimientos hídricos de las plantas en su ambiente natural. Estos parámetros se deben determinar para cada especie; como punto de partida es aconsejable referirse a los datos de especies lo más cercanamente emparentadas que estén disponibles, o bien, con requerimientos hídricos similares.

Tabla 2.1. Ejemplos de los tiempos y frecuencias de inmersión empleados en algunas especies vegetales para su propagación *in vitro* en sistemas de inmersión temporal.

Especie	Referencia	Tipo de biorreactor	Inmersión	
			Tiempo	Frecuencia
Especies herbáceas				
<i>Dianthus caryophyllus</i> L.	Thi <i>et al.</i> , 2019	TIS Plantima *	30 s	8 h
<i>Guarianthe skinneri</i> (Bateman) Dressler et W. E. Higging	Leyva-Ovalle <i>et al.</i> , 2020	Tanques gemelos	2 min	4 h
<i>Jeffersonia dubia</i> (Maxim.) Benth et Hook	Jeong y Sivanesan, 2016	TIS Plantima *	30 s	30 min
Híbridos de <i>Saccharum</i> spp.	Martínez-Rivero <i>et al.</i> , 2020	Tanques gemelos	4 min	3 h
<i>Musa</i> AAA x Grand Naine	Bello-Bello <i>et al.</i> , 2020	Tanques gemelos	4 min	4 h
Especies leñosas				
<i>Citrus x latifolia</i> (Yu. Tanaka) Yu. Tanaka	Bulbarela-Marini <i>et al.</i> , 2019	RITA *	5 min	4 h
<i>Prunus avium</i> L.	Godoy <i>et al.</i> , 2017	Tanques gemelos	3 min	8 h
<i>Pistacia vera</i> 'Siirt', <i>P. atlántica</i> Desf. y <i>P. khinjuk</i>	Akdemir <i>et al.</i> , 2014	RITA *	24 min	16 h
<i>Salix viminalis</i>	Regueira <i>et al.</i> , 2019	RITA *	1 min	4 h
<i>Vaccinium corymbosum</i>	Arencibia <i>et al.</i> , 2018	Tanques gemelos	3 min	8 h

Al registrar y analizar las respuestas de los explantes cultivados en sistemas de inmersión temporal, se debe poner especial atención a la proporción de brotes hiperhidratados; para disminuir este problema una de las primeras

alternativas a las que se puede recurrir es reducir el tiempo de inmersión, la frecuencia de inmersión o ambos. Al bombear el medio del recipiente que contiene los explantes al recipiente que funciona como reservorio, siempre quedará una película de líquido sobre las plantas, lo que no siempre resulta positivo para los cultivos vegetales; así que otra estrategia que ha funcionado en algunas especies como *Olea europaea* y *Rhodiola crenulata*, por mencionar un par de ejemplos, es administrar lo que se conoce como ventilación adicional o ciclos secos, que consiste en bombear solo aire al recipiente que contiene a los explantes, en periodos intercalados con las inmersiones en medio líquido. Esto permite reducir la película de medio líquido que queda sobre los explantes, así como renovar con más frecuencia la atmósfera interna del biorreactor.

Una vez que se conocen los tiempos y frecuencias de inmersión apropiados para la especie estudiada, se pueden evaluar distintas concentraciones de RCVs, pues como se ha mencionado, la disponibilidad y por lo tanto eficacia de los mismos es mayor en medios líquidos que en medios semisólidos, y en principio cabe la posibilidad de obtener resultados equiparables o mejores con menores concentraciones de RCV, aunque esto se debe verificar experimentalmente para cada especie.

Protocolos

Protocolo 2.1

Protocolo para la propagación en biorreactores tipo tanque gemelo de *Heterotecha inuloides* y *Ruta chalepensis*; plantas herbáceas muy empleadas en la medicina tradicional. Para poder recuperar y validar estos conocimientos ancestrales, es necesario revisarlos con un riguroso enfoque científico. Para realizar estudios posteriores, es muy útil contar con sistemas de propagación *in vitro* que permitan obtener una gran cantidad de material vegetal en poco tiempo, además de que, en caso de encontrar compuestos de interés, posteriormente estos mismos sistemas de cultivo *in vitro* podrán facilitar la búsqueda de estrategias para incrementar la producción de metabolitos secundarios, por ejemplo, la adición de elicitores al medio de cultivo.

Material

1. Cultivos *in vitro* de *H. inuloides* y *R. chalepensis*.
2. El medio de cultivo basal empleado fue MS, según la fórmula original de Murashige & Skoog (1962). Los medios empleados fueron:
 - Control: Medio basal adicionado con 8 g L⁻¹ de agar.
 - Para *H. inuloides*: tratamiento 1 (medio basal) y tratamiento 2 (Medio adicionado con 1 mg/L de ácido indolacético).
 - Para *R. chalepensis*: tratamiento 1 (medio basal) y tratamiento 2 (Medio adicionado con 0.1 mg/L de benciladenina).
3. Biorreactores tipo tanques gemelos, con recipientes de vidrio de 1 L de capacidad (Fig 1).

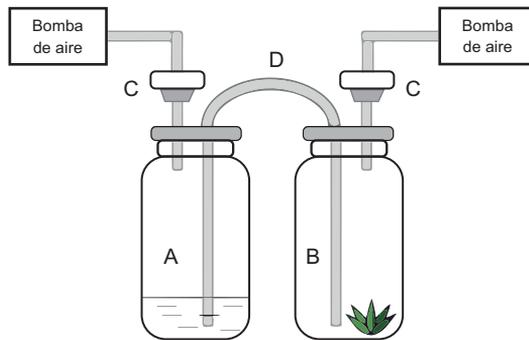


Figura 2.1. Esquema de biorreactor de inmersión temporal de tipo tanques gemelos.

El recipiente A es el reservorio del medio de cultivo; el recipiente B contiene a los explantes.

El aire bombeado al recipiente A pasa a través de un filtro hidrofóbico (C), presuriza el interior de A y empuja el medio líquido al recipiente B, a través de una manguera que conecta ambos recipientes (D). Al finalizar el tiempo de inmersión, se bombea aire al recipiente B para forzar al medio a regresar al recipiente A.

Todos los medios y los biorreactores fueron esterilizados en autoclave a 1.2 kg/cm² y 121 °C por 20 min.

Procedimiento

1. Todas las manipulaciones de BITs y explantes se llevaron a cabo en campana de flujo laminar, para garantizar condiciones axénicas.
2. A partir de los cultivos previamente establecidos *in vitro* de ambas especies, se obtuvieron segmentos nodales con al menos una yema.
3. En cada biorreactor se colocaron 100 ml de medio, según el tratamiento correspondiente, y cinco explantes.
4. Las condiciones de cultivo consistieron en una temperatura de $25 + 2$ °C con un fotoperiodo 16 h luz / 8 h oscuridad, bajo lámparas fluorescentes de luz blanca. En el caso de los experimentos en biorreactores, se utilizó una inmersión de 5 min cada 3 h.
5. Después de 60 d de incubación se registró el número de brotes por explante.
6. El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPrism®; se efectuó el test de Kruskal-Wallis ($P < 0.05$) y para comparar las medias se utilizó el test de Dunn.

Resultados

El empleo de biorreactores de inmersión temporal tuvo un efecto positivo en la propagación masiva de ambas especies (Fig. 2.2). En *H. inuloides* hay una diferencia estadísticamente significativa entre el uso de biorreactores y el uso de medios semisólidos; en este caso, no hubo diferencia significativa entre añadir o no AIA al medio de cultivo (Fig. 2.2). En el caso de *R. chalapensis* el uso de medio sin reguladores en biorreactores, o en sistemas tradicionales, no supone una diferencia estadísticamente significativa; sin embargo, adicionar BA al medio de cultivo, y al emplear biorreactores, hay un incremento en el promedio de brotes generados.

En ninguna de las dos especies se presentó hiperhidratación de los brotes ni de los explantes, por lo cual consideramos que el tiempo y frecuencia de inmersión que se utilizaron son los adecuados.

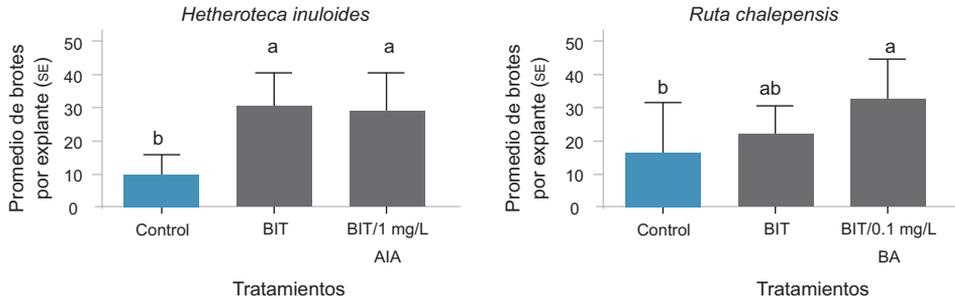


Figura 2.2. Promedio de brotes por explante en *H. inuloides* y *R. chalepensis*. Letras iguales indican que no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos según el test de Dunn con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$.

Abreviaturas

- ADN: ácido desoxirribonucleico
 BA: benciladenina
 BIT: biorreactor de inmersión temporal
 RCV: reguladores de crecimiento vegetal

Bibliografía

- Akdemir, H., Süzerer, V., Onay, A., Tilkat, E., Ersali, Y. & Çiftçi, Y.O. (2014). Micropropagation of the pistachio and its rootstocks by temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 117: 65-76
- Afreen, F. (2008). Temporary immersion bioreactor. En *Plan Tissue Culture Engeneering*. (187-201). Dordrecht, Holanda: Springer.
- Bello-Bello, J.J., Cruz-Cruz, C.A. & Pérez-Guerra, J.C. (2019). A new temporary immersion system for commercial micropropagation of banana (*Musa* AAA cv. Grand Naine). *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 55,313-320
- Benelli, C. & De Carlo, A. (2018). *In vitro* multiplication and growth improvement of *Olea europaea* L. cv canino with temporary immersion system (Plantform™). *Biotech*, 8, 317.

- Berthouly, M. & Etienne, H. (2005). Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. En *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. (165-195). Dordrecht, Holanda: Springer.
- Bulbarela-Marini, J.E., Gómez-Merino, F.C., Galindo-Tovar, M.E., Solano-Rodríguez, L.A., Murguía-González, J., Pastelín-Solano, M.C., Nuñez-Pastrana, R. & Castañeda-Castro, O. (2019). The *in vitro* propagation system of *Citrus x latifolia* (Yu. Tanaka) Yu. Tanaka (Rutaceae) affects the growth and depletion of nutrients. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. 55, 290-295
- Dewir, Y.H., Indoliya, Y., Chakrabarty, D. & Paek, K.Y. (2014). Biochemical and Physiological Aspects of Hyperhydricity in Liquid Culture System. En *Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology*. (693-709). Dordrecht, Holanda: Springer.
- Eibl, R. & Eibl, D. (2008). Design of bioreactors suitable for plant cell and tissue cultures. *Phytochemistry Reviews*, 7, 593-598
- Escalona, M., Lorenzo, J.C., González, B., Daquinta, M., González, J.L., Desjardins, Y. & Borroto, C.G. (1999). Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*, 18, 743-748
- Georgiev, M.I. (2014). Design of Bioreactors for Plant Cell and Organ Cultures. En: *Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology*. (3-15). Dordrecht, Holanda: Springer.
- Godoy, S., Tapia, E., Seit, P., Andrade, D., Sánchez, E., Andrade, P., Almeida, A.M. & Prieto, H. (2017). Temporary immersion systems for the mass propagation of sweet cherry cultivars and cherry rootstocks: development of a micropropagation procedure and effect of culture conditions on plant quality. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 53, 494-504
- Jeong, B.R. & Sivanesan, I. (2016). Micropropagation, berberine content and antitumor activity of *Jeffersonia dubia* (Maxim.) Benth et Hook. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 124, 453-458
- Leyva-Ovalle, O.R., Bello-Bello, J.J., Murguía-González, J. Núñez-Pastrana & R., Ramírez-Mosqueda, M.A. (2020). Micropropagation of *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler et W. E. Higging in Temporary Immersion Systems. *Biotech*, 10, 26.

- Li, F., Weng, J. (2017). Desmystifying traditional herbal medicine with modern approach. *Nature Plants*, 3, 17109.
- Mamun, N.H.A., Egertsdotter, U. & Aidun, C.K. (2015). Bioreactor technology for clonal propagation of plants and metabolite production. *Frontiers in Biology*, 10:177
- Martínez-Rivero, A., Ramírez-Mosqueda, M.A., Mosqueda-Frómeta, O., Escalona-Morgado, M.M., Rivas-Paneca, M., Rodríguez-Escriba, R.C., Daquinta-Gradaille & Bello-Bello, J.J. (2020). Influence of Vitrofurul[®] on sugarcane micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 141, 447-453
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497
- Paek, K. Y., Chakrabarty, D. & Hahn, E.J. (2005). Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. En: *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation* (95-116). Dordrecht, Holanda: Springer.
- Regueira, M., Rial, E., Blanco, B., Bogo, B. Aldrey, A., Correa, B., Varas, E., Sánchez, C. & Nieves, V. (2018). Micropropagation of axillary shoots of *Salix viminalis* using a temporary immersion system. *Trees*, 32, 61-71
- Takayama, S. & Akita, M. (2005). Practical aspects of bioreactor application in mass propagation of plants. En: *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. (6-78). Dordrecht, Holanda: Springer.
- Thi, L.T., Park, Y.G. & Jeong, B.R. (2019). Growth and development of carnation 'Dreambyul' plantlets in a temporary immersion system and comparisons with conventional solid culture methods. In *Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 55, 539-548
- Zhao, Y., Sun, W., Wang, Y., Saxena, P.K. & Liu, C. (2012). Improved Mass Multiplication of *Rhodiola crenulata* Shoots Using Temporary Immersion Bioreactor with Forced Ventilation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166, 1480-1490
- Ziv, M. (2005). Simple bioreactors for mass propagation of plants. En *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. (79-93). Dordrecht, Holanda: Springer.