

22

EFICIENCIA

**DEL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL FRENTE AL
METODO DE PROPAGACION CONVENCIONAL IN VITRO**

EFICIENCIA

DEL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL FRENTE AL METODO DE PROPAGACION CONVENCIONAL IN VITRO

EFFICIENCY OF THE TEMPORARY IMMERSION SYSTEM VERSUS THE CONVENTIONAL IN VITRO PROPAGATION METHOD

Ana Luisa Castillo Ontaneda¹

E-mail: acastillo@utmachala.edu.ec

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8458-5346>

Alexander Moreno Herrera¹

E-mail: amoreno@utmachala.edu.ec

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8898-4195>

Rigoberto Miguel García Batista¹

E-mail: rmgarcia@utmachala.edu.ec

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2403-0135>

¹ Universidad Técnica de Machala. Ecuador.

Cita sugerida (APA, séptima edición)

Castillo Ontaneda, A. L., Moreno Herrera, A., García Batista, R. M. (2020). Eficiencia del sistema de inmersión temporal frente al método de propagación convencional in vitro. *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 3(2), 173-182.

RESUMEN

El trabajo se desarrolló con el objetivo de valorar la eficiencia de los métodos de propagación masiva de vitroplantas mediante resultados obtenidos en el Método convencional y el Sistema de Inmersión Temporal (SIT) y lograr aumentos en el coeficiente de multiplicación, además caracterizar ambos métodos de micropropagación in vitro mediante su descripción. Considerando que los métodos convencionales de propagación, resultarían lentos en producir y de elevados costos de producción. Esta técnica permite elaborar una planificación adecuada, desde la fase de establecimiento del cultivo aséptico en laboratorio, hasta el establecimiento y producción del cultivo en el campo. Sin embargo, en los cultivos de inmersión temporal, la constitución y el proceder fisiológico de los brotes son muy parecidos a los que se muestran en ambientes ex vitro, debido a la evolución del ambiente del sistema.

Palabras clave:

Inmersión temporal, vitroplantas, eficiencia.

ABSTRACT

The work was carried out with the aim of assessing the efficiency of the methods of mass propagation of vitroplants through results obtained in the Conventional Method and the Temporary Immersion System (SIT) and achieve increases in the multiplication coefficient, in addition to characterizing both methods of in vitro micropropagation by describing them. Considering that conventional propagation methods would be slow to produce and of high production costs. This technique allows for proper planning, from the stage of establishment of aseptic culture in the laboratory, to the establishment and production of the crop in the field. However, in temporary immersion crops, the constitution and physiological proceeding of outbreaks are very similar to those shown in ex vitro environments, due to the evolution of the system environment.

Keywords:

Temporary immersion, vitroplants, efficiency.

INTRODUCCIÓN

La micropropagación de plantas igualmente llamada clonación in vitro de plantas, es una de los instrumentos de la biotecnología vegetal que más progreso ha tenido en los últimos años. A través de esta técnica nos permite mejorar la eficiencia en la propagación de los cultivos obteniendo así de esta manera material de alta calidad genética y fitosanitaria. Entre los métodos de propagación in vitro se encuentra la micro propagación convencional, la embriogénesis somática citado por Llanos (2015), y el cultivo de inmersión temporal.

Esto ha motivado el desarrollo de tecnologías que permitan automatizar los procedimientos de micro propagación, que puedan ser aplicados a diferentes cultivos y que además favorezcan la aclimatación y endurecimiento de plantas en invernadero. El obtener una tasa alta de multiplicación nos facilita una mayor calidad a la planta para la etapa de adaptación. El sistema de inmersión temporal tiene una gran ventaja en la multiplicación masal de las Bromelias, es que el contacto del medio líquido, con el tejido del explante, se realiza de manera intermitente y no permanente; evitando la vitrificación de los explantes, generando en poco tiempo una mayor cantidad de material vegetativo, que mantenga su calidad.

Utilizando métodos convencionales de propagación, resultarían lentos en producir y de elevados costos de producción. Esta técnica también permite elaborar una planificación adecuada, desde la fase de establecimiento del cultivo aséptico en laboratorio, hasta el establecimiento y producción del cultivo en el campo. Son muchos los factores que afectan el crecimiento de los brotes en el cultivo in vitro. En cambio, en los cultivos de inmersión temporal, la constitución y el proceder fisiológico de los brotes son muy parecidos a los que se muestran en ambientes ex vitro, debido a la evolución del ambiente del sistema.

El uso del SIT, reduce los costos de producción por planta; esto como consecuencia de la mecanización de algunas etapas de la micropropagación. El análisis sobre estos dos métodos de micropropagación de plantas ya que en datos reportados por Winkelmann, et al. (2006), indican que, en biorreactores, la obtención de plántulas reduce los costos de producción entre un 50 y 60 %. El objetivo del estudio va dirigido a analizar la eficiencia de métodos de propagación masiva de vitroplantas mediante resultados en convencional y Sistema de Inmersión Temporal (SIT) para lograr aumento del coeficiente de multiplicación, así como Caracterizar los dos métodos de micropropagación in vitro mediante la descripción del convencional y Sistema de inmersión temporal (SIT) para incrementar el potencial fisiológico de las vitroplantas.

DESARROLLO.

Métodos de micropropagación in vitro, descripción del convencional y SIT para la mejora fisiológica de las vitroplantas. Propagación convencional de vitroplantas.

La manera tradicional con la que el agricultor utiliza para la instalación de nuevas plantaciones en el cual manipula los retoños, hijos o vástagos emergen del tallo de la planta. Según Llanos. (2015), estos se utilizan como material de propagación, descritos como: Retoños de corona, el ápice de la inflorescencia conformada por las brácteas foliares y progresa paralelamente con el crecimiento del fruto, poniéndose en un estado de aparente pasividad a la maduración, Vástagos de los pedúnculos, (bulbillos), se a crecentan en las uniones de las hojillas del pedúnculo, Retoños del tallo, se localizan en la región de transformación entre el esqueje y el apéndice y Retoños con raíces, son los que crecen en el pie de la planta.

Suárez Haro (2011), indica que cualquier parte de una planta puede dar origen a otra de similares características siempre y cuando tomando en cuenta las condiciones de crecimiento; la potencia celular máxima de las células no diferenciadas. Los desarrollos de estos métodos parten de la propagación vegetativa que consta de tres diferenciaciones que son: la propagación por partes vegetativas, la segunda es la propagación por injertos y la tercera es la propagación in vitro por células o pequeños segmentos de tejidos u órganos son sembrados en condiciones vigiladas de laboratorio.

La propagación por cultivo de tejidos ha tomado gran valor en la propagación masiva de plantas y la preservación de especies en peligro de extinción o que han sido amenazadas por muchos factores (Suárez Haro, 2011; y Vásquez, et al., 2015). Con la multiplicación vegetativa se pretenden ciertos puntos trascendentales como los que se nombrara a continuación: Valorar genéticamente material vegetal, incluyendo estudios de interacción genotipo ambiente, manifestaciones juveniles y maduras de una misma característica, Preservar genotipos y complejos genéticos en bancos clónales y arboretos. Acortar ciclos reproductivos para acelerar procesos de cruzamiento y prueba, Conservar genotipos superiores que determinan características genéticas favorables resistencia a plagas y o enfermedades crecimiento, producción, calidad de frutos, tolerancia a condiciones extremas de humedad o sequía, etc. Estas características se pueden “perder” por el cruzamiento genético en la propagación sexual, Ser más eficiente cuando la reproducción sexual no es el método más viable o eficaz, Propagar especies que sus semillas presentan problemas de germinación o de almacenamiento o que son de ciclo reproductivo largo, Aprovechar las características genéticas favorables de dos plantas en una sola planta, Manejar las diferentes fases del desarrollo de las plantas, Obtener plantaciones uniformes o la producción de un determinado número de individuos con identidad genética.

Ángel & González, (2013) indican que la micropropagación in vitro, se realiza en ambientes completamente limpios, es viable reestablecer en escaso período de tiempo miles o un sinnúmero de vegetales genéticamente

semejantes a la planta madre a partir de un minúsculo pedazo inicial de epitelio de cualquier fragmento de la mata, cuando a este tegumento le es adaptado una incitación por medio de variables físicas y químicas vigiladas en un medio de cultivo.

Pierik (1990), en el cultivo in vitro hay diferentes tipos de cultivo y en la constitución de la planta hay materiales diferentes. Los tipos de cultivos son los de plantas intactas: que se siembran la semilla in vitro; cultivos de embriones: se siembra el embrión aislado; se cultiva in vitro un órgano aislado: se distinguen distintos tipos: cultivo de meristemas, cultivos de ápices del vástago, cultivo de raíces, cultivo de anteras etc. Cultivo de callo: se llama así cuando una porción de tejido se diferencia in vitro; cultivo de células aisladas: Son células que crecen individualmente obtenidas a partir de un tejido, callo o cultivo en suspensión, con la ayuda de enzimas o mecánicamente; cultivo de protoplastos: se obtiene a partir de células, por digestión enzimática de la pared celular.

El avance de la técnica de cultivos es favorable por la rapidez en la propagación de la planta, se fundamenta en sitiar un fragmento de la planta (explante) bajo condiciones asépticas, sea esta una célula, un tejido o un órgano y suministrar artificialmente las condiciones físicas y químicas adecuadas para que las células expresen su potencial interior o inducido. Los laboratorios que se usan para la micropropagación in vitro son más especializados debido a que se usa una técnica más elaborada. Sin embargo, esta técnica puede ser empleada no solo para obtener plantas sanas sino cuando no existe material suficiente para establecer una plantación nos indica.

El método de micropropagación in vitro de plantas presenta significativas ventajas que están concernientes con el aumento acelerado del número de plantas por cada espécimen, la obtención de material de propagación en corto tiempo, constante producción de material, simplificar costos y multiplicar grandes cantidades de plantas en un pequeño espacio, tener un mayor control sobre la sanidad del material propagado, al transportar material se logra tener un mejor control, cuando se posean pocos individuos de una variedad o eco tipo se pueda propagar de manera eficiente y rápida.

Los procesos de multiplicación in vitro admiten el logro de una gran cuantía de vegetales a partir de una planta madre en breves periodos de tiempo, así como la reducción del área física disponible para la multiplicación, decadencia del lapso de propagación de una planta y los precios del proceso que esta involucra.

Asimismo, el rendimiento de una plantación a través de la multiplicación excluye la probabilidad de obstáculos debido a los cambios del tiempo ya que se puede vigilar los ambientes como la humedad y temperatura en un invernáculo. Sin embargo, el método es de gran beneficio en la producción de plantas libres de patógenos; plantas

homocigotas, en la obtención de plantas en riesgo de extinción, en saberes de ingeniería genética (Ángel & González, 2013).

Ángel & González, indica que hay dos categorías en el desarrollo en el cultivo In vitro: a) organizado: se designa así cuando se manipulan puntos de desarrollo (meristemas apicales) de tallos y raíces, yemas florales, pequeños frutos, nudos y cultivo de embriones. Estos tejidos cuando son sembrados in vitro prolongan creciendo con su organización. Y se denomina b) desorganizado: cuando fragmentos de tejidos son plantados in vitro estos escasean de estructuras diferenciadas. El tegumento desorganizado puede aumentar en corpulencia por continuos subcultivos y conservarse en medio de cultivo por etapas largas.

Cultivo de callos (células agregadas), cultivo de anteras y de polen (para obtener plantas haploides) son estimados de crecimiento organizado como un camino intermedio para la reproducción de plántulas. (Ángel & González, 2013).

En la fase de micropropagación el método convencional in vitro emplea diferentes medios de cultivo de tipo semisólido y líquido como en la fase de establecimiento se utiliza medio sólido, semi-sólido y líquido, fase de multiplicación medio sólido y semisólido, fase de enraizamiento medio sólido y semisólido. La naturaleza física del medio de cultivo si influencia en el crecimiento de los explantes y la tasa de formación de brotes durante el proceso de la micropropagación. Comúnmente es conveniente solidificar el medio de cultivo con agar u otro gelificante, para así asegurar que el material vegetal tenga un soporte, de tal manera proveer suficiente aireación a los explantes. Por otra parte, en medios semi-sólidos los explantes pueden ser observados fácilmente para así poder ser manipulados y los brotes y raíces crecen de forma ordenada en un medio estacionario.

A través de diferentes estudios se ha determinado una serie de ventajas de los medios líquidos para la micropropagación de plantas y se mencionan las siguientes: difusión de nutrientes, la difusión del agua, los brotes in vitro se ven afectados en su desarrollo por las impurezas que tiene el agar. Los elementos minerales son una fuente transcendental en la congregación final de un medio anverso a la carga de los edificadores del agente gelificante. Se considera la interacción entre gelificante-medio de cultivo retizan un papel significativo durante el proceso de los tejidos in vitro.

El uso del medio líquido para la proliferación in vitro brinda otras mejoras y se estima que es una técnica perfecta para la reproducción masiva de plantas, porque disminuye el manejo y es una exigencia precisa para la sistematización del proceso.

Adelberg (2004), indica que las ventajas que tienen los sistemas de cultivo en medio líquido frente al medio sólido

o semisólido son varias y se fundamenta en lo siguiente: El medio se produce a un bajo costo, La preparación del medio de cultivo se lo hace en un periodo corto de tiempo, Se evitan las impurezas del agar u otro agente solidificante, La eficiencia del trabajo del técnico aumenta en la cámara de flujo laminar, En el cuarto de cultivo se permite un uso más eficiente del espacio, El consumo de energía es menor, A gran escala se simplifica el manejo y El crecimiento vegetal se acelera.

Muñoz (2006), menciona que el rápido crecimiento del explante se debe probablemente a que una mayor superficie se encuentra en contacto con el medio líquido permitiendo así una mejor absorción del nutriente. George & Sherrington (1984), argumentan que los metabolitos tóxicos pueden acumularse alrededor de los tejidos y que más fácilmente son dispersados por los medios líquidos por consecuencia de la dilución.

Los sistemas de cultivo en medio líquido tienen las siguientes desventajas, Son muy complejos y los costos de los sistemas mecánicos necesarios para manejar el oxígeno y relaciones hídricas. Otro factor es que los medios líquidos deben ser agitados constantemente o rotados o aireados por otros medios que demandan aparatos o frascos de cultivos exclusivos, Cuando las plantas van a la aclimatación se alcanza una gran pérdida de plantas por la pobre calidad de las mismas o por Hiperhidricidad, El uso de contenedores de mayor tamaño produce pérdidas por contaminación, Falta de instrumental.

Para superar estas desventajas se han diseñado diferentes sistemas de cultivos en medios líquidos. Se agrupan estos sistemas en dos tipos, sistema de cultivo sumergido y de inmersión parcial. Los primeros son modificaciones de fermentadores y agitadores para cultivos celulares originalmente usados para microorganismos.

Mientras que los cultivos de inmersión parcial son más simples por ser sistemas mecánicos aquí se incluyen materiales inertes dentro de los frascos como puentes de papel, membranas o esponjas. Existen plataformas a modo de mecedoras o balancines que no permiten que se sumerja constantemente los explantes. Otra forma de inmersión parcial se fundamenta en la utilización de flujos de aire a presión que mueven los fluidos entre reservorios y frascos de cultivo a estos sistemas se los denomina sistema de inmersión temporal según Muñoz (2006).

La desventaja principal es que incita la hiperhidricidad del tegumento de los renuevos. Para prevenir esa desorganización fisiológica, se han desarrollado inmensos métodos, entre los que se tropiezan el cultivo en movimiento el uso de puntales superpuestos como puentes de papel de filtro, tapones de celulosa, esponjas, canastas flotantes, etc.

Una de las desventajas en el sistema de micropropagación convencional es que los frascos empleados se reduce la densidad del inóculo por envase empleado,

aumentando así el espacio físico necesario para el crecimiento de plántulas en la sala de incubación.

El estudioso en emplear una técnica de inmersión periódica en medios de cultivo líquido fue Steward et al., (1952); cuya innovación realizada en el año 1956 fue designada "los aparatos Steward". En este advenimiento el medio líquido era trasladado de un tubo a otro admitiendo el tejido en una fase gaseosa y viceversa. Por repetidas veces se realizaron otros intentos siguiendo el mismo principio y fue hasta 1985 que Tisserat y Vandercook operaron el primer equipo automatizado que aplicaba el principio de "cambio de flujo lo que dio inicio al debate acerca del cultivar tejidos in vitro que permanezcan temporalmente inmersos en un determinado medio.

Según Albarracín (2012), en 1993, Alvard, y colaboradores introdujeron el envase RITA siendo en 1995 Tiesson & Alvard, quienes desplegaron la nueva concepción del SIT para cultivo in vitro de plantas utilizando medios líquidos, lo que fortuitamente generaría un interés a nivel universal por esta innovadora técnica.). Se inician muchas actividades y ensayos en sistemas de inmersión temporal trascendiendo en la diversificación en el diseño de depósitos, aparatos y tratamientos fundamentados en tiempos de inmersión y periodicidad que estribarían verdaderamente de los tipos de cultivos de utilidad. Este tipo de sistemas aludidos mostrarían varias ventajas de funcionamiento y rendimiento; además, por otro lado, ciertas características como contraparte que implican deficiencias que serán explicadas posteriormente.

Es ineludible conocer que cerca de quinientos millones de plantas clonadas in vitro estuvieron desarrolladas en el año 1990 en laboratorios de Europa occidental, Estados Unidos e Israel; obtención que se concentra en laboratorios comerciales cuyo objetivo es la multiplicación de una especie vegetal específica de acuerdo a sus requerimientos. Hasta la fecha estas cantidades se permanecen en acrecentamiento y la proliferación de plantas in vitro se ha acrecentado en niveles exponenciales hacia países de América Latina como Cuba, Brasil, Costa Rica entre otros. En estudios realizados por Albarracín (2012).

En el año 1995, el CIRAD (La Recherche Agronomique Pour Le Développement, 2009) crea un sistema denominado de Inmersión temporal. El mismo que posee como característica la semi-automatización de su empleo para la propagación de plántulas in vitro. Básicamente consiste de un recipiente en el que por medio de la aplicación de un flujo de aire se hace pasar medio de cultivo hacia los explantes durante un tiempo y frecuencia de inmersión pre determinados; posterior a dicho tiempo, el medio de cultivo líquido desciende por gravedad hasta que un nuevo ciclo de inmersión ocurra.

Los sistemas de inmersión temporal (SIT) en el cultivo de tejidos vegetales establecen una tecnología asequible debido a que nos permite automatizar de forma parcial

algunas etapas del cultivo in vitro, acrecentando la eficiencia biológica y productiva del material propagado sin los efectos colaterales ocasionados por los medios de cultivo líquido estáticos conocidos como hiperhidricidad e hipoxia.

Todas las partes de la planta entran en contacto con el medio líquido a través del SIT, además nos permite una completa renovación de la atmosfera interna del recipiente por ventilación forzada, la cual empuja el líquido hacia el material vegetal mediante la transmisión neumática desde un contenedor a otro recipiente que contiene las plantas. Una válvula llamada solenoide administra una sobrepresión y un compresor acoplado a un temporizador programable. Esto determina el tiempo y duración de la inmersión.

En sistema de inmersión temporal se utiliza en la fase de micropropagación el Cultivo de suspensión de células (medio líquido agitado), cultivo de protoplastos (células sin pared celular) y cultivo de suspensión de células (medio líquido) son estimados de crecimiento organizado como un camino intermedio para la reproducción de plántulas. (Ángel & González, 2013).

El empleo de sistemas semi-automáticos de micro propagación es importante siempre y cuando estén basados en el sistema de inmersión temporal ya que constituye una alternativa válida siempre y cuando se trate de rescatar especies de usos ancestrales que tienen propiedades químicas de interés para la salud humana, y muchas de ellas se encuentran en peligro de extinción y es necesario efectuar un régimen de mejoramiento genético.

En este sistema han sido desarrolladas dos variantes y actualmente se encuentran en el mercado internacional: El recipiente para sistema de inmersión temporal automatizado (RITA) y el sistema de frascos gemelos (BIT). El sistema RITA consta de envases con capacidad de un litro que comprenden dos compartimientos, uno que se encuentra ubicado en la parte superior en donde se encuentran las plantas y uno inferior conteniendo el medio.

La sobrepresión aplicada en el compartimento más bajo empuja el medio hacia el superior. Las plantas están sumergidas tanto tiempo como la presión es aplicada. Durante el período de inmersión el aire es insuflado a través del medio, agitando los tejidos suavemente y renovando la atmósfera dentro del frasco, con la sobrepresión escapando a través de salidas en la parte superior del aparato. Este sistema fue desarrollado para propagación masiva vía embriogénesis somática.

El sistema de frascos gemelos es utilizado para la organogénesis, el tamaño de los propágulos puede requerir un volumen más grande y recipientes de menor costo. En este sistema se utiliza un frasco que mantiene las plantas y otro como reservorio de medio de cultivo. Los vasos se conectan entre sí mediante una manguera de silicona que se inserta en la tapa de cada recipiente que desciende

hasta el fondo, de modo de permitir el intercambio de medio de cultivo. La conexión se realiza a través de filtros hidrófobos de 0,2 micras que garantiza la esterilidad del aire de entrada. La presión del aire es controlada por un manómetro y el ritmo de inmersión está regulada por un temporizador, el cual controla válvulas solenoides que al abrirse indistintamente permiten la circulación del aire y por consiguiente del medio de cultivo de un recipiente a otro.

Etiene & Berthouly (2002), indican que se han detallados diferentes sistemas de inmersión temporal, estos encierran la transmisión neumática del medio de cultivo desde un depósito a un contenedor en el que se localizan las plantas. Como el sistema no incluye un depósito con medio fresco, el medio de cultivo debe ser renovado cada 4 a 6 semanas. Sin embargo, el reemplazo es rápido y no hay necesidad de transferencia de material vegetal.

Es un sistema cegado consta de dos frascos de plástico de (44 cm de diámetro y 26 cm de altura (tejido), uno de los frascos fue manipulado para ubicar el explante, retoños de plántulas in vitro (del tercer o cuarto sub-cultivo) y en la otra botella está el medio de cultivo; los tapones poseen dos vías de acceso, una para la ventilación con su concerniente filtro y otra para el compensación de medio de cultivo entre ambos contenedores, se usan conductos de silicona (10 mm de diámetro y 1.5 mm de espesor.

En cada frasco el paso del aire es esterilizado por filtros hidrofóbicos (0,2 μm , ACRO R, Pall Corporation). Por medio de electroválvulas se normaliza la ventilación, las cuales son vigiladas por medio de un temporizador MICRO PC- MOLLER R, que al mismo tiempo vigila el fotoperiodo. La micropropagación de plantas requiere la transferencia periódica del cultivo a medio fresco debido al agotamiento y/o alteración de los nutrientes, así como, al crecimiento o proliferación continua del tejido, que sobre pasa la capacidad del frasco de cultivo. Generalmente, los cultivos se mantienen en frascos individuales y se transfiere a medio fresco en un intervalo de cuatro a seis semanas.

Algunos sistemas de micropropagación alternativos con el empleo de medio líquido se han desarrollado con el propósito de la automatización del proceso y la consiguiente reducción de los costos (Pieper & Zimmer, 1976; Simonton, Robacher & Krueger, 1991). Más recientemente Teisson & Alvard (1995), desarrollaron un aparato para la micropropagación de plantas a partir de la modificación de una unidad de filtración Nalgene de 250 ml de capacidad cuyo nombre comercial es RITA.

La tecnología accesible que admite mecanizar de carácter parcial cualesquiera de los períodos del cultivo in vitro se encuentra los sistemas de inmersión temporal (SIT) que permiten incrementar la eficiencia biológica y provechosa del material desarrollado sin los impactos colaterales originados por los medios de cultivo líquido estáticos destacados como hiperhidricidad e hipoxia (De Feria,

Jiménez & Chávez, 2002). El principio básico es la inmersión periódica de los explantes en el medio de cultivo, lo que permite el intercambio gaseoso dentro del recipiente.

La práctica de doble capa, la refrigeración de la base del pomo de cultivo el estudio de los nutrimentos en forma de neblina el uso de tegumentos para desarrollar la compensación gaseosa en la botella de cultivo y reducir la emanación de agua, así como el destino de agentes químicos antivitrificantes asimilaron cinco técnicas desiguales de cultivo en balance con el cultivo en medio sólido en la reproducción de meristemas de banano.

A partir de estas derivaciones nació una nueva percepción para el cultivo in vitro en medio líquido: la SIT. Este método se ha manipulado exitosamente con otras especies de plantas (*Coffea*, *Hevea*, *Musa*, *Citrus*) y en otras técnicas de proliferación (multiplicación de meristemas, cultivo de microestacas, crecimiento de embriones a partir de callo, así como la formación y transformación de embriones somáticos). La propiedad de la mejora de los renuevos es universalmente mejor a la que se consigue con el uso del medio líquido o semisólido.

Los sistemas de inmersión temporal emplean medios líquidos lo cual facilita la asimilación de nutrientes por lo explantes. La planta entra en contacto con este medio con cierta frecuencia durante un corto período de tiempo lo que evita los problemas de hiperhidricidad (desorden morfológico y fisiológico que provoca una estructura cristalina y acuosa del tejido, además de un crecimiento distorsionado) provocados por los medios líquidos en contacto permanente.

Además, estos sistemas permiten la renovación constante de la atmósfera interna de los frascos y evita la acumulación de gases nocivos como el etileno (que promueve la senescencia de los tejidos). Los SIT facilitan la regulación de la concentración de CO₂ y mejoran la oxigenación de los tejidos. Los explantes retienen una película del medio de cultivo que evita la desecación e incrementa la disponibilidad y asimilación de nutrientes, lo cual se traduce en un incremento más vigoroso y mejor desarrollo. Además, los SIT favorecen la fotosíntesis de las plantas cultivadas in vitro.

La humedad relativa del aire en el compartimento que contiene los explantes está saturada permanentemente durante los períodos de oscuridad y se mantiene por encima del 98% durante los períodos de luz. Esto debido al carácter hidrofóbico del filtro (que esteriliza el aire entrante al sistema) y la presencia de la película de medio alrededor de los tejidos. Otro parámetro significativo es la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo líquido. En los SIT tipo RITA se alcanza la saturación solo un minuto después del burbujeo.

Los sistemas de inmersión temporal (SIT) constituyen una tecnología accesible que permite automatizar de forma parcial algunas etapas del cultivo in vitro, aumentando la

eficiencia biológica y productiva del material propagado sin los efectos colaterales causados por los medios de cultivo líquido estáticos conocidos como hiperhidricidad e hipoxia (De Fera, et al., 2002). El principio básico es la inmersión periódica de los explantes en el medio de cultivo, lo que permite el intercambio gaseoso dentro del recipiente.

El funcionamiento del SIT está condicionado al manejo de los factores físicos que influyen en el desarrollo tanto para el sistema convencional como el sistema de inmersión temporal. Las condiciones ambientales que deben mantenerse los cultivos de tejidos vegetales son similares a las naturales más propicias. La luz, la humedad relativa y la temperatura son los factores primordiales del ambiente que incurren sobre los cultivos (Ángel & González, 2013)

El desenvolvimiento de varios plantíos obedece de la calidad, intensidad y fotoperiodo de la luz que absorben, dado que algunas enzimas envueltas en el proceso y en la desintegración secundaria necesitan la incidencia directa de la luz. La totalidad de los cultivos despliegan a una intensidad lumínica entre 5 a 25 W/m² (1000 a 5000 lux). La calidad de la luz logra establecer otras respuestas morfo génicas, habitualmente se utiliza luz blanca, carente en longitudes de onda larga. El fotoperiodo corrientemente manejado es de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, no obstante, unos cultivos demandan oscuridad (Marín, 1993).

Se regula en general las temperaturas de las cámaras de cultivo entre 22 y 28°C, admitiendo así el crecimiento de variedades de climas templados como de plantas de climas tórridos. Destaca que, durante la etapa iluminada, el temple en el interior de los pomos del cultivo es de 1-2°C preferente a la de la cámara, digno al efecto invernadero; se crea así un termo período suave. El nivel de producción y acumulación de metabolitos y la velocidad de síntesis y de degradación de distintos compuestos es influenciado por la temperatura (Marín, 1993).

La humedad relativa, se conserva en cerca del 70 % en las circunstancias en las que se ejecutan corrientemente los cultivos, no obstante, varía con la temperatura de la cámara y el tipo y cierre de los receptáculos. El porcentaje de humedad relativa no es logrado en la mayoría de las labores sobre cultivo in vitro de vegetales (Ángel & González, 2013).

Una vez acondicionado los factores limitantes se inician diversas actividades y pruebas en sistemas de inmersión temporal resultando en la variación en el diseño de recipientes, equipos y tratamientos basados en tiempos de inmersión y frecuencias que dependerían directamente de los tipos de cultivo de interés.

El Sistema RITA® es un recipiente especialmente diseñado para el cultivo in vitro de plantas usando la inmersión temporal. Los explantes son colocados en la parte superior del recipiente y el medio de cultivo en la parte

inferior. Un flujo de aire con una presión menor de 0.2 bares entra a través de un filtro de 0.2 μ el cual es conectado a un tubo central creando una presión en el medio de cultivo en la parte inferior del recipiente. Esta presión permite que el medio pueda ascender hacia la parte superior del recipiente a través de los orificios de la placa y la malla que contiene los explantes. Estos son inmersos en el medio de cultivo durante el tiempo en que la presión es programada. Una vez que la presión se elimina, el medio de cultivo retorna por gravedad a la parte inferior del recipiente.

Albarracín (2012), es necesario conocer que alrededor de 500 millones de plantas clonadas in vitro fueron propagadas en 1990 en laboratorios de Europa occidental, Estados Unidos e Israel; producción que se concentra en laboratorios comerciales cuyo objetivo es la propagación de una especie vegetal específica de acuerdo a sus requerimientos. Hasta la actualidad estas cifras se mantienen en aumento y la propagación de plantas in vitro se ha incrementado en niveles exponenciales hasta países de América Latina como Cuba, Brasil, Costa Rica, entre otros. También menciona que es importante recalcar que los datos citados corresponden a plantas cultivadas en condiciones in vitro mediante propagación convencional, es decir, la técnica conocida como la primera generación experimentada en diversos países a nivel mundial. Dicha metodología implica tecnología avanzada y capacitación técnica de alta disciplina por lo que sus costos representan rubros elevados en lo que corresponde a mano de obra, instalaciones, insumos y materiales de alta calidad.

De allí que la tendencia al cambio ha envuelto también a las técnicas biotecnológicas con la finalidad de satisfacer las demandas comerciales por diversos cultivos, las cuales mediante los sistemas de propagación tradicional no son satisfechas. Por ello, se han buscado tecnologías que consigan hacer de la micropropagación un proceso más efectivo reduciendo costos e incrementando el número de plantas de producción in vitro tal como lo permiten los sistemas de inmersión temporal con el empleo de medios de cultivo líquido.

El sistema biorreactor consiste en 2 contenedores uno para el crecimiento de la planta y un reservorio para el medio líquido, los 2 contenedores son conectados por tubos de siliconas y vidrio. Dentro de cada contenedor, el flujo del aire es estéril por que pasa por los filtros hidrofóbicos de 0,2 μ m. La presión del aire desde un compresor de aire empuja el medio desde un contenedor al otro hasta sumergir a la planta completamente.

El flujo de aire es reversible hasta retirar el medio desde el contenedor de cultivo, el tiempo es controlado electrónicamente la frecuencia y duración del período de inmersión, esto se realizará en intervalos de tres horas. El temporizador electrónico controlará las electroválvulas que permiten la ejecución.

Una vez que se tiene preparado el equipo para ser usado se procede a preparar el medio según el tratamiento que se van a realizar y se coloca 1 L en los contenedores, una vez armado el sistema completo serán autoclavados a 121° C con una presión de 15 psi ó 1 atm por un período de tiempo de 20 minutos, se recomienda realizarlo de esta forma para evitar cualquier agente contaminante.

Estudios realizados por (Ángel & González, 2013) demuestran que el efecto de la frecuencia de inmersión en el desarrollo de brotes puede explicarse por la disponibilidad de los nutrientes. González, indica que utilizar una mayor frecuencia de inmersión puede presentar efectos como una baja en la concentración de oxígeno.

El choque osmótico sufrido por los explantes durante cada inmersión en el medio de cultivo, posiblemente a mayor frecuencia los tejidos sufran un nivel de estrés que afecte la respuesta del explante (Ángel & González, 2013). En sistemas de inmersión temporal de cultivo con tejido, es evidente que el tiempo de inmersión es muy importante, puesto que regula la absorción de nutrientes y expresión de hiperhidricidad. Los tiempos de inmersión utilizados para diferentes trabajos varían considerablemente; esto es probablemente debido a la gran variedad de especies, procesos y sistemas de micropropagación de inmersión temporal utilizado. Los largos tiempos de inmersión (1 h cada 6 h) demuestran ser eficaces para la tuberización de papa, mientras que los cortos tiempos de inmersión (1 min cada 12 h) estimulan la producción de embriones somáticos más en el café y el caucho.

La aireación es uno de los factores más influyentes sobre la propagación in vitro mediante sistemas de inmersión temporal. En primer lugar, debido al ingreso del flujo de aire a los envases del SIT se acciona el mecanismo de cada ciclo de inmersión que eventualmente mantendrá a los explantes en contacto con el medio de cultivo líquido. Además, señala que el empleo de biorreactores con levantamiento de aire presenta un aumento en la proliferación de yemas meristemáticas y una reducción de los cortes de los tejidos siendo este el resultado deseado al propagar plántulas mediante SIT.

Como se mencionó anteriormente, el mecanismo de traslado de medio de cultivo de un recipiente al otro en el sistema de inmersión temporal es accionado por la presión de un flujo de aire de entrada ejercida mediante el compresor por las válvulas de carga y descarga, generando así dicho mecanismo; de allí que el SIT es considerado bajo estas condiciones un biorreactor agitado por flujo de aire, lo que implica que esta entrada de aire genere turbulencia.

La turbulencia o efecto de la agitación puede constituirse en un problema para el cultivo de células o tejidos en suspensión debido a la formación de grupos o agregados los cuales afectan a la agitación, por lo tanto, a la difusión del oxígeno. Además, si en un ciclo de inmersión en el

Sistema de Inmersión Temporal, la turbulencia generada es excesiva, esto puede causar la destrucción del tejido. Por ello, dicho factor debe ser controlado adoptando diversas medidas que reduzcan la afectación del cultivo tales como: el empleo de una presión de flujo de aire correcta que será determinada para cada tipo de cultivo y especie de interés, un control mediante variaciones en la composición del medio de cultivo que eviten la formación de agregados celulares y además la manipulación durante los subcultivos.

Es particularmente importante optimizar el volumen del medio de cultivo líquido por explante cuando se utiliza sistemas de inmersión temporal, tales como sistemas RITA®. Berthouly & Etienne (2005), encontraron que multiplicando por 10 veces el volumen de medio de cultivo para brotes de caña de azúcar. Se incrementaba el coeficiente de multiplicación de 8.3 brotes por explante a 23.9 brotes transcurridos 30 días. Sin embargo, el volumen de medio utilizado no afectó la longitud de los brotes formados. Los mayores volúmenes demuestran ser menos eficiente.

Utilizando el mismo sistema de inmersión temporal, Berthouly & Etienne (2005), demostraron de manera similar con piña que un volumen de medio de cultivo óptimo para la proliferación de brotes, que se estimó es 200 ml por explante para esa especie. En este caso, volúmenes más grandes también condujo a una caída en la tasa de proliferación.

Como se mencionó anteriormente, el empleo de medio de cultivo líquido en las diferentes etapas de la micropropagación favorece el desarrollo de explantes y tal como se ha reportado para diferentes especies vegetales existen incrementos significativos de la tasa de proliferación. Sin embargo, se ha citado también la acumulación de biomasa como factor altamente influyente en el cultivo mediante este tipo de técnica como los sistemas de inmersión temporal. La acumulación de excesiva biomasa en los Sistemas Inmersión Temporal se presenta principalmente por factores como excesivo desarrollo y crecimiento de los propágulos una vez transcurrido el ciclo de multiplicación. Dicho crecimiento puede afectar el índice de multiplicación y disminuirlo considerablemente, por ende, la eficiencia del Sistema de Inmersión Temporal también se vería afectado. Albarracín (2012), ha señalado que el uso de retardantes de crecimiento en los medios de cultivo logra disminuir el crecimiento de hojas y estimulan la producción de nuevos brotes disminuyendo la probabilidad de afectación sobre el coeficiente de proliferación debido a acumulación de biomasa.

El SIT presenta un amplio número de ventajas al propagar plantas de interés mediante este tipo de técnica, ya que los nutrientes del medio de cultivo están más fácilmente disponibles en medios de cultivo líquido y las plantas adquieren una mayor capacidad de absorción.

El contacto intermitente con el medio de cultivo en la superficie del explante permite un máximo crecimiento de las plántulas tras los ciclos de inmersión; considerándose así, la frecuencia, tiempo de inmersión y densidad del inóculo, los tres parámetros principales y determinantes para el empleo de SIT en la propagación masiva de plantas.

Así también una ventaja adicional del SIT consiste en el espacio que brinda el emplear envases de grandes capacidades. En los sistemas de inmersión se utilizan frascos grandes herméticos de 100 ml, pudiéndose utilizar de esta manera un mayor número de explantes en cada contenedor.

Disminuye los costos de la mano de obra, debido a la facilidad de manipulación de los explantes y del cambio de medio. Permite una mejor nutrición mineral, por el contacto estrecho entre la superficie de los explantes y el medio durante la fase de inmersión por capilaridad, ya que una fina película de medio se mantiene sobre los explantes. Existe una fuerte disminución de los problemas de asfíxia o vitrificación de los tejidos en comparación con una inmersión permanente, ya que permite una renovación completa del aire dentro del recipiente durante cada inmersión. También permite una mejor separación de los tejidos o células bajo el efecto de las burbujas y mayor control de los procesos morfológicos debido a la frecuencia de las inmersiones (Ángel & González, 2013). Permite la protección de cada recipiente contra la contaminación por medio del uso de filtros, además la manipulación individual es fácil y anula los riesgos de contaminación cruzada (Ángel & González, 2013).

CONCLUSIONES

El SIT presenta un amplio número de ventajas al propagar plantas de interés mediante este tipo de técnica, ya que los nutrientes del medio de cultivo están más fácilmente disponibles en medios de cultivo líquido y las plantas adquieren una mayor capacidad de absorción.

La forma de contacto del medio de cultivo (permanente o intermitente) afecta principalmente la calidad de las plantas, dada siempre por el porcentaje de explantes hiperhidratados.

El contacto intermitente con el medio de cultivo en la superficie del explante permite un máximo crecimiento de las plántulas tras los ciclos de inmersión; considerándose así, la frecuencia, tiempo de inmersión y densidad del inóculo, los tres parámetros principales y determinantes para el empleo de SIT en la propagación masiva de plantas.

Así también una ventaja adicional del SIT consiste en el espacio que brinda el emplear envases de grandes capacidades. En los sistemas de inmersión se utilizan frascos grandes herméticos de 100 ml, pudiéndose utilizar

de esta manera un mayor número de explantes en cada contenedor.

Disminuye los costos de la mano de obra, debido a la facilidad de manipulación de los explantes y del cambio de medio. Permite una mejor nutrición mineral, por el contacto estrecho entre la superficie de los explantes y el medio durante la fase de inmersión por capilaridad, ya que una fina película de medio se mantiene sobre los explantes. Existe una fuerte disminución de los problemas de asfixia o vitrificación de los tejidos en comparación con una inmersión permanente, ya que permite una renovación completa del aire dentro del recipiente durante cada inmersión. También permite una mejor separación de los tejidos o células bajo el efecto de las burbujas y mayor control de los procesos morfológicos debido a la frecuencia de las inmersiones.

Una de las desventajas en el sistema de micropropagación convencional es que los frascos empleados se reduce la densidad del inóculo por envase empleado, aumentando así el espacio físico necesario para el crecimiento de plántulas en la sala de incubación.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Adelberg, J. (2004). Plant growth and sugar utilization in an agitated, thin-film liquid system for micropropagation. *In vitro Cellular and Developmental-Plant* 40(3), 245-250.

Albarracín Acosta, C. P. (2012). *Evaluación de la eficiencia de un sistema de inmersión temporal frente al método de propagación convencional en la multiplicación in vitro de cilantro cimarrón (eryngium foetidum) a partir de hojas, yemas y segmentos nodales*. Carrera de Ingeniería en Biotecnología. ESPE. Sede Sangolquí.

Ángel Molina, J. X., González Cabrera, J. J. (2013). *Evaluación de dos métodos de micropropagación masal en piña (Ananas comosus L.Merr.) variedad golden*. (Tesis para optar el título de Ingeniero Agrónomo). Universidad de El Salvador.

Berthouly, M., & Etienne, H. (2005). *Temporaly inmersión system:a new concept for use liquid medium in mass propagation*. Eds.AK Hvoslet-Eide.

De Feria, M., Jiménez, E., & Chávez, M. (2002). Empleo de los sistemas de inmersión temporal para la multiplicación in vitro de brotes de Saccharum Spp. Var. I BP-112. *Biotecnología Vegetal*, 2(3), 143-147.

Etienne, H., & y Berthouly, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69, 215 - 231.

George, E., & y Sherrington, P. (1984). *Plant propagation by tissue culture*. Eastem Press.

Llanos, C. I. (2015). *Micropropagación in vitro de piña, Ananas comosus (L.) Merr Var. MD2 (Bromeliaceae) bajo un sistema de biorreactores de inmersión temporal*. (Tesis Especialización en Ciencias Biológicas). Universidad Mayor de San Marcos.

Marín, J. A. (1993). Micropropagación de especies frutales. *Horto Frutic*, 1, 56-62.

Muñoz David, M. A. (2006). *Estudio de sistemas de cultivo in vitro, aclimatización de plántulas y crecimiento de bulbos en tres especies de Rhodophiala Presl. (Amaryllidaceae)*. (Tesis de Maestría). Universidad Austral de Chile.

Pieper, W., & Zimmer, K. (1976). A simple, inexpensive apparatus for in vitro propagation of tissues. *Gartenbauwissenschaft*, 41(5), 221-224.

Pierik, R. L. (1990). Cultivo in vitro de las plantas superiores. Mundi Prensa.

Simonton, W., Robacher, C., & Krueger, S. (1991). A programmable micropropagation apparatus using cycled liquid medium. *Tissue and Organ Culture*, 27, 211 - 218. .

Suárez Haro, F. E. (2015). *Micropropagación in vitro de piña(ananas comosus l.merril)híbrido md-2,a partir de cortes de yemas laterales y apicales*. (Tesis de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias). Universidad de las Fuerzas Armadas.

Teisson, C., & Alvard, D. (1995). A new concept of plant in vitro cultivation liquid medium: Temporary Immersion. En, M., Terzi, R., Cella, A., Falavigna, *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*. (pp. 105 - 109). Kluwer Academic Publishers.

Vásquez, C., Orozco, A., Rojas, M., Sánchez, M. E., & Cervantes, V. (2015). *La reproducción de plantas semillas y meristemos*. Fondo de Cultura Económica.