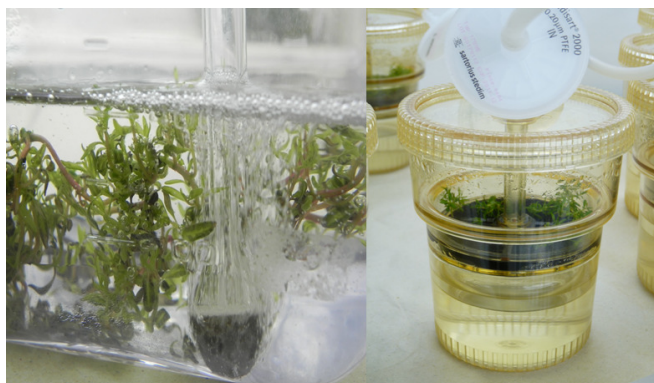




Universidad de la República

Facultad de Ciencias

Desarrollo de una técnica para micropropagación de especies leñosas en biorreactores



Maestría en Biotecnología

Ing. Agr. Martín Perugorría Larroque

**Tutor: Ing. Agr. (MSc) Alicia Castillo
Laboratorio de Biotecnología
Las Brujas. INIA**

**Tutor académico: Dr. Pedro Díaz Gadea
Laboratorio de Bioquímica
Facultad de Agronomía**

RESUMEN

La calidad genética y sanitaria son cualidades que se buscan cada vez más en la producción viverística a nivel mundial, con el objetivo de obtener plantas genéticamente homogéneas y libres de virus. Dentro de esta realidad, el cultivo *in vitro* significa una herramienta muy útil para lograr este objetivo, gracias a las características de producción que posee. La limitante económica que significan los altos costos de producción de este sistema, hace que se sigan utilizando otras alternativas menos eficientes como la producción por estacas o por semilla.

Dentro de lo que es la producción *in vitro*, la multiplicación de plantas en medios de cultivo líquido por medio de biorreactores, representa una posibilidad de generar un mayor número de plantas en menos tiempo y con costos inferiores en comparación al sistema de producción en medio sólido.

Los problemas a superar en este sistema de multiplicación de plantas, son la contaminación con hongos y bacterias, y la deformación de los tejidos causada por la hiperhidricidad o vitrificación, que sufren los explantos sumergidos en el medio de cultivo, afectando la anatomía y fisiología de las plantas y por lo tanto, su sobrevivencia.

En este trabajo se utilizaron dos especies leñosas, *Eucalyptus grandis* y el portainjerto M9 de *Malus domestica* con el objetivo de ajustar la tecnología de los biorreactores de inmersión temporal RITA® y de inmersión permanente en estas especies.

Para superar los efectos de hiperhidricidad o vitrificación, se incluyeron en el medio de cultivo floroglucinol, ácido cítrico y ácido ascórbico como compuestos para controlar o minimizar los síntomas de hiperhidricidad. También se propusieron para RITA® dos frecuencias de inmersiones, la primera, de 1 minuto cada 3 horas, y la segunda de 1 minuto cada 8 horas.

Los parámetros medidos para evaluar los resultados de los sistemas de propagación propuestos, fueron el nivel de proliferación alcanzado con cada uno, el porcentaje de vitrificación que presentaban las plantas, el estrés oxidativo a través de la actividad de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa, y el nivel de daño, estimado con el grado de peroxidación lipídica observado en cada especie. Para eucalipto, también se evaluó el efecto residual que se observa en las plantas una vez que se repican en medio sólido luego de haber sido multiplicadas en medio líquido (BIP).

Los mejores resultados productivos para el caso del portainjerto M9 en las alternativas de cultivo en medio líquido, se lograron en las plantas crecidas en los RITA®, utilizando una frecuencia de inmersión de 1 minuto cada 8 horas y agregando 100 mg/L de ácido cítrico al medio de cultivo, donde se alcanzó una tasa de proliferación de 2.8 y un porcentaje de vitrificación del 30%.

En eucalipto, los mejores resultados se obtuvieron en el cultivo en los BIP donde se logró una tasa de multiplicación de 18.1 y un porcentaje de vitrificación del 10%, sin presentar diferencias significativas entre los tratamientos con y sin floroglucinol. Cuando esas plantas se repicaron en medio de cultivo sólido, se observó un efecto residual que determinó una tasa de multiplicación de 7.6 y no se observaron síntomas de vitrificación.

LISTA DE ABREVIACIONES:

ANA Ácido naftalenoacético

BAP 6-Bencil amino purina

BIP Biorreactores de inmersión permanente

CAT Catalasa

DKW Medio de cultivo (Driver y Kuniyuki, 1984)

MDA Malondialdeído

RITA[®] Recipiente de inmersión temporaria automatizada

ROS Especies reactivas del oxígeno

SOD Superóxido dismutasa

TBARS Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico

WPM Medio de cultivo (Lloyd y Mc Cown, 1980)

INDICE

1	Introducción.....	1
1.1	Estrategias de micropropagación.....	1
1.2	Medio de cultivo líquidos.....	4
1.3	Biorreactores.....	4
1.3.1	Aireación y control de gases en biorreactores.....	5
1.3.2	Características de los medios líquidos.....	6
1.3.3	Ventajas y desventajas del uso de biorreactores.....	7
1.3.4	Modelos de biorreactores.....	7
1.3.4.1	Biorreactores de inmersión temporal.....	8
1.3.4.2	Biorreactores de inmersión permanente..	9
1.4	Principal limitante de la multiplicación en biorreactores.....	9
1.4.1	Vitrificación.....	9
1.4.2	Estrés oxidativo.....	12
1.4.2.1	Especies reactivas del oxígeno.....	12
1.4.2.2	Daño celular.....	13
1.5	Estrategias para superar los daños resultantes de la vitrificación.....	15
1.5.1	Antioxidantes.....	15
1.1.5.1.1	Superóxido dismutasa.....	16
1.1.5.1.2	Catalasa.....	17
1.1.5.1.3	Acido ascórbico.....	18
1.1.5.1.4	Ácido cítrico.....	18
1.1.5.2	Floroglucinol.....	19
1.1.6	Material vegetal.....	20

	1.1.6.1Portainjerto M9.....	20
	1.1.6.1.1 Producción de manzana en Uruguay...	21
	1.1.6.1.2 Micropropagación de portainjertos de manzano en medio líquido.....	21
	1.1.6.2Eucalipto.....	23
	1.1.6.2.1 Importancia del eucalipto en Uruguay..	23
	1.1.6.2.2 Micropropagación de eucaliptos en medio líquido.....	24
2	Objetivos.....	26
	2.1 Objetivo general.....	26
	2.2 Objetivos específicos.....	26
3	Materiales y métodos.....	27
	3.1 Material a propagar.....	27
	3.2 Medios de cultivo.....	27
	3.2.1 Portainjerto M9.....	27
	3.2.2 Eucalipto.....	27
	3.3 Sistemas de propagación.....	28
	3.3.1 Sistema RITA®	29
	3.3.2 Biorreactores de inmersión permanente.....	30
	3.4 Parámetros evaluados.....	31
	3.4.1 Portainjerto M9.....	31
	3.4.1.1Variables que intervienen en el proceso de crecimiento en biorreactores.....	31
	3.4.1.2Evaluación de proliferación y grado de vitrificación	32
	3.4.1.3Estrategias para superar los efectos de la vitrificación.....	32
	3.4.2 Eucalipto.....	32

3.4.2.1	Variables que intervienen en el proceso de crecimiento en biorreactores.....	33
3.4.2.2	Evaluación de proliferación y grado de vitrificación.....	34
3.4.2.3	Estrategias para superar los efectos de la vitrificación.....	34
3.4.2.4	Repique de las plantas al medio sólido.....	34
3.5	Parámetros metabólicos y fisiológicos.....	35
3.5.1	Peróxidos de lípidos TBARS.....	35
3.5.2	Proteínas totales.....	35
3.5.3	Extracción de enzimas.....	36
3.5.4	Actividad SOD.....	36
3.5.5	Actividad de la Catalasa.....	36
3.4	Análisis estadístico.....	36
4	Resultados.....	37
4.1	Portainjerto M9.....	37
4.1.1	Tasa de multiplicación.....	37
4.1.1.1	Inmersión temporal.....	37
4.1.1.2	Inmersión permanente.....	39
4.1.2	Vitrificación.....	40
4.1.2.1	Inmersión temporal.....	40
4.1.2.2	Inmersión permanente.....	42
4.1.3	Daño celular en tejidos de plantas de M9.....	43
4.1.4	Actividad SOD.....	44
4.1.5	Actividad Catalasa.....	46
4.2	Eucalipto.....	47
4.2.1	Tasa de multiplicación.....	47

	4.2.1.1Inmersión temporal.....	47
	4.2.1.2Inmersión permanente.....	48
	4.2.2 Repique de las plantas al medio sólido.....	48
	4.2.2.1Altura máxima de las plantas.....	49
	4.2.2.2Peso fresco de las plantas.....	50
	4.2.2.3Tasa de proliferación.....	51
	4.2.3 Porcentaje de vitrificación.....	51
	4.2.3.1Inmersión temporal.....	52
	4.2.3.2Inmersión permanente.....	53
	4.2.4 Actividad SOD.....	54
5	Discusión.....	56
5.1	Tasa de proliferación de las especies leñosas evaluadas.....	56
5.2	Repique de las plantas al medio sólido.....	58
5.3	Porcentaje de vitrificación.....	59
	5.3.1 Portainjerto M9.....	60
	5.3.2 Eucalipto.....	61
5.4	Estrés oxidativo en medio líquido.....	62
	5.4.1 Daño celular en tejidos de plantas de M9.....	62
	5.4.2 SOD y CAT.....	63
	5.4.2.1Portainjerto M9.....	64
	5.4.2.2Eucaliptos.....	64
5.5	Mejoras comparativas del sistema de producción.....	65
6	Conclusiones.....	67
7	Bibliografía.....	68

1 INTRODUCCION

La presente tesis se enmarca en una realidad nacional y mundial que apunta a una producción de plantas de óptima calidad desde el punto de vista genético y sanitario de las plantas producidas y cuya escala productiva resulte en una mayor rentabilidad económica. Buscando cumplir con estas demandas del mercado es que se plantea la puesta a punto de una tecnología que maximice la productividad mediante la optimización en el uso de los recursos utilizados, garantizando la calidad de la producción.

1.1 Estrategias de micropropagación

La técnica de propagación *in vitro* se basa en la habilidad de regenerar plantas completas a partir de la diferenciación y rediferenciación de células vegetales, generalmente provenientes de plantas maduras, a esta facultad se la denomina totipotencia. La regeneración es potenciada por dos vías morfogénicas, la organogénesis y la embriogénesis somática. La micropropagación es una técnica aplicada para la rápida multiplicación de plantas. Esta técnica posee un gran potencial comercial debido a la velocidad de propagación, la alta calidad de plantas que se obtienen y la posibilidad de producir plantas libres de patógenos (Steward et al., 1970; Ammirato, 1985). El uso de esta tecnología también se enfoca a otras aplicaciones tales como la producción de doble haploides, criopreservación, propagación de nuevas variedades de plantas, conservación de nuevas plantas o en peligro de extinción, propagación de plantas difíciles de multiplicar, producción de metabolitos secundarios y generación de plantas transgénicas.

La principal ventaja de este sistema de propagación es la producción de material vegetal de alta calidad y uniformidad en corto tiempo y bajo condiciones de cultivo libre de enfermedades independientemente de la estación del año y las condiciones del clima. Como contraparte, la técnica de micropropagación es más costosa que los métodos tradicionales de producción de plantas y el uso de biorreactores posibilita la producción masiva de plantas bajando los costos de producción (FAO/IAEA, 2004). El proceso incluye pasos que van desde el cuidado y mantenimiento del stock de plantas madre, la esterilización e introducción del material *in vitro*, la manipulación de medios de cultivo para la proliferación de los explantos, la elongación de los brotes, el desarrollo de raíces por parte de los mismos y la aclimatación de las plantas producidas. Todas estas etapas, el

requerimiento de mucha mano de obra y la necesidad de trabajar en condiciones de esterilidad, hacen de éste un proceso de altos costos de operación. (George, 1993).

El esquema clásico del proceso de la micropropagación consta de cinco fases: pre propagación, introducción de explantos, multiplicación de esos explantos, enraizamiento y aclimatación de las plantas. Cabe destacar que a nivel comercial, cada vez mas se recurre al enraizamiento *ex vitro* por diversas razones, entre ellas, la de bajar los costos de producción.

Fase de pre propagación

Es una fase de selección y preparación del material madre que dará origen a los explantos que se introducirán *in vitro*. Incluye el uso de insecticidas, funguicidas y formulaciones antimicrobianas para minimizar la posibilidad de ocurrencia de contaminación *in vitro* (George, 1993; Guri y Patel, 1998; Holdgate y Zandvoort, 1997).

Es la base para un protocolo de micropropagación responsable y confiable que asegure no solo la calidad sanitaria del material, sino también la tasa de sobrevivencia del mismo.

Fase de introducción de los explantos

También llamada fase de iniciación, comienza con la desinfección del material a introducir con diferentes productos químicos como hipoclorito de sodio o alcohol. Esta etapa implica el establecimiento exitoso de cultivos asépticos a partir de material seleccionado. Los explantos deben ser transferidos a las condiciones de cultivo *in vitro* en laboratorio, y una vez establecidos, pueden ser multiplicadas sucesivas veces (George, 1993; Holdgate y Zandvoort, 1997).

Fase de multiplicación de explantos

Es la fase de multiplicación del material introducido en la fase uno. Mediante el manejo de diferentes reguladores de crecimiento y el control de las condiciones de desarrollo, cada explanto forma una planta independiente y da origen a nuevos individuos que se someterán a nuevas subdivisiones para incrementar el número de plantas. Este incremento depende de la combinación del medio de cultivo, condiciones de crecimiento y

características particulares de la planta, pero pueden esperarse tasas de multiplicación de entre 2 y 5 en cada repique. Algunas veces esta etapa requiere de un proceso de elongación de los explantos previo a la fase de enraizamiento.

Fase de enraizamiento de los explantos

Una vez alcanzado el número deseado de plantas según los planes de producción, el material es preparado para su aclimatación y pasaje a tierra. En la mayoría de los casos esta etapa incluye elongación y desarrollo de raíces de las plantas. Un buen desarrollo radicular puede ser determinante en la sobrevivencia de las plantas en su etapa *ex vitro*. El proceso de enraizamiento *in vitro* llega a significar entre el 35-75% de los costos totales de la producción (Debergh y Maene, 1981).

Fase de aclimatación

En esta última etapa las plantas obtenidas se trasplantan a condiciones *ex vitro* y puede representar pérdidas considerables si no se hace cuidadosamente. Las principales variables a controlar son el contenido de humedad, temperatura y luminosidad. A medida que las plantas se van aclimatando se van haciendo más resistentes a las nuevas condiciones ambientales similares a las de campo.

El establecimiento de la micropropagación comercial como industria tiene sus comienzos en las décadas de los 70 y 80 y se han logrado significativos avances desde entonces en el cultivo de plantas y células *in vitro* (Jones y Sluis, 1991). El uso de la tecnología *in vitro* para la propagación de plantas, ha tenido un gran desarrollo en la industria de la horticultura y la forestación. Esta técnica ha hecho posible la regeneración de portainjertos de varios tipos de plantas frutales, ornamentales, vegetales y plantas medicinales (Zakaria et al., 2001). En la actualidad existen protocolos de propagación clonal masiva para un gran número de especies, aunque inicialmente en la fruticultura, esta tecnología fue utilizada en cultivos de pequeños frutos como frutillas y grosellas, así como portainjertos de árboles frutales, especialmente durazneros (Bhatt y Todaria, 1990).

En el sector forestal, la micropropagación significará una alternativa comercial de gran importancia en comparación con la propagación tradicional gracias a la rápida ganancia genética que ofrece en los programas de mejoramiento. Los altos costos en que

incurre esta técnica pueden ser una de las mayores limitante (FAO/IAEA, 2004). Esta técnica es extremadamente intensiva en cuanto al uso de mano de obra, atribuyéndose a la manipulación de las plantas aproximadamente el 46% de los costos del proceso. Se hace necesaria la reducción de los costos para la generalización de esta tecnología y en respuesta a esta demanda es imprescindible la automatización del proceso productivo para la optimización del uso de los recursos (George, 1993). La eficiencia del proceso de micropropagación desde el punto de vista comercial, depende de una rápida y prolongada fase de proliferación con grandes escalas de producción. Además es necesario el desarrollo de plantas sanas y normales durante la aclimatación para asegurar altos porcentajes de sobrevivencia (Preece y Sutter 1991; Ziv 1991a, b, 1995).

1.2 Medios de cultivo líquidos

El uso de medios líquidos se ha reportado para el cultivo de células y órganos vegetales, y embriones somáticos en diferentes tipos de biorreactores (Smart y Fowler 1984; Ammirato y Styer 1985; Stuart et al., 1987; Chen et al., 1987; Preil, 1991; Paque et al., 1992; Scragg, 1992; Attree et al., 1994; Ziv, 1995; Archambault et al., 1995; Tautorius y Dunstan 1995). Se han observado resultados de propagación de diferentes especies vegetales en medio líquido donde las tasas de multiplicación y la calidad de las plantas han sido óptimas (Alvard et al., 1993; Teisson y Alvard 1995; Etienne et al., 1997). Las ventajas asociadas al cultivo en medios líquidos aireados en biorreactores, incluyen mejor contacto entre las plantas y el medio de cultivo, aporte de oxígeno sin restricciones, control de la composición del medio y de la atmósfera gaseosa y la posibilidad de manipular la biomasa vegetal en relación al volumen de medio (Cazzulino et al., 1991; Heyerdahl et al., 1995; Leathers et al., 1995).

1.3 Biorreactores

Los biorreactores son aparatos diseñados para el cultivo a gran escala de células, tejidos u órganos en medio líquido. Para un creciente número de especies, estos han mostrado ventajas sobre la micropropagación en medio semisólido, resultando en mayores tasas de multiplicación, reducción de espacio, energía y mano de obra (FAO/IAEA, 2004). La mecanización y automatización de los procesos de micropropagación pueden aportar una solución para superar la limitación que significa la intensiva labor de las técnicas

convencionales de propagación de plantas (Levin et al., 1988; Aitken-Christie 1991, Aitken-Christie et al., 1995; Vasil, 1994). Los progresos en la automatización del cultivo de tejidos dependen del uso de medios líquidos en biorreactores (Alper et al., 1993; Sakamoto et al., 1995). Esta técnica está reportada para diferentes especies donde ha mostrado disminuir el uso de mano de obra, y por lo tanto, los costos de producción (Levin et al., 1988; Ziv, 1990, 1992a, b, 1995; Vasil 1994; Aitken-Christie et al., 1995).

La aireación y circulación de burbujas en el biorreactor para el intercambio de oxígeno con la biomasa, se da a través de un aspersor de aire colocado en la base del contenedor (Merchuk, 1990). Por otro lado, el continuo movimiento de los explantos promueve una menor expresión de la dominancia apical, generando la inducción y proliferación de numerosas yemas axilares. Los biorreactores son un rápido y eficiente sistema de propagación clonal, por otro lado, la automatización de dicho sistema de micropropagación ha sido propuesta por varios autores como una vía para la reducción de costos (Mehrotra et al., 2007). Para hacer eficiente una producción a gran escala, tanto por embriogénesis somática como por organogénesis, la configuración del birreactor y su volumen deben ser determinados de acuerdo a los requerimientos de aireación del material a propagar (Doran, 1993; Hvoslef-Eide y Munster, 1998).

El control de la morfogénesis y el crecimiento de la biomasa en biorreactores requieren de la manipulación de las condiciones de cultivo, tales como, la atmósfera, la relación entre oxígeno y dióxido de carbono, pH, minerales, carbohidratos y reguladores de crecimiento (Heyerdahl et al., 1995). Además, el control de la fase gaseosa en los biorreactores depende del flujo de gas y puede ser fácilmente manipulado para satisfacer los requerimientos de oxígeno y dióxido de carbono. Las columnas de burbujas en los biorreactores son utilizadas tanto para la oxigenación como para la agitación de los explantos (Scragg, 1992; Doran, 1993).

1.3.1 Aireación y control de gases en biorreactores

La aireación del cultivo asegura la oxigenación del medio y la agitación de las plantas, con lo cual se evita la sedimentación de la biomasa. Una excesiva agitación puede ocasionar daños en el cultivo y, en el caso de cultivos celulares, la formación de espuma en la parte superior del biorreactor (Scragg, 1992). Como la biomasa aumenta y el cultivo se vuelve viscoso, se requieren mayores tasas de aireación para asegurar su oxigenación y agitación. La viscosidad y espuma del medio, aunque no son un problema tan grave como

en el caso de cultivo de células vegetales, pueden disminuirse con el uso de la mitad de la concentración de minerales del medio MS y bajando los niveles de calcio del mismo (Takayama et al., 1991; Ziv, 1991b).

Los niveles de oxígeno en los cultivos líquidos dependen de la presencia de este gas en las burbujas que circulan a través del biorreactor y de las condiciones que favorecen la transferencia de oxígeno de ellas a la biomasa (Cazzulino et al., 1991). El flujo de aire que circula por el biorreactor y el tamaño de las burbujas son las dos herramientas que controlan el coeficiente de transferencia de oxígeno y el estrés mecánico de la agitación (Takayama y Akita, 1998).

Trabajos previos muestran el efecto beneficioso del enriquecimiento con dióxido de carbono en medios de cultivo en el crecimiento de las plantas en la fase de aclimatación *ex vitro* (Kozai et al., 1992). Por otro lado se han podido ver efectos de reducción del crecimiento por excesiva oxigenación y remoción de dióxido de carbono y otros gases volátiles (Hegarty et al., 1986; Kim et al., 1991).

Además, en plantas cultivadas en biorreactores, la tasa de aireación puede afectar los niveles de etileno. Altas tasas de aireación pueden causar un “lavado” de gases necesarios para el crecimiento de las plantas (Ilan et al., 1995).

1.3.2 Características de los medios líquidos de los biorreactores

Medios de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) o sus modificaciones, son tomados como base para el cultivo con medios líquidos. El consumo de nutrientes minerales depende del tamaño y tipo de las plantas a desarrollar y de condiciones de cultivo tales como, pH, temperatura, luz, aireación, concentración de minerales, volumen y viscosidad del medio (Williams, 1992; Debergh et al., 1992).

Las plantas cultivadas en medios líquidos tienen una mayor exposición a los componentes de ese medio y su consumo es más rápido. En biorreactores con condensadores o humidificantes del aire utilizados para prevenir la deshidratación, los niveles de nutrientes en el medio dependen de la tasa de absorción de la planta (Archambault et al., 1994).

En cuanto al pH, los medios de cultivo tienen un pH inicial en el orden de 5.5 y 5.9, el cual durante la esterilización del medio y el crecimiento de las plantas disminuye a 4 y 4.5, lo cual está relacionado al consumo de amonio. Generalmente el pH vuelve a aumentar

luego gracias al consumo de nitrato (Stuart et al., 1987; Preil, 1991; Ziv y Hadar, 1991; Lulsdorf et al., 1993; Jay et al., 1994).

El uso de reguladores de crecimiento en sistemas de cultivo con medios líquidos es más eficiente que en el caso de medios con agar debido al contacto directo entre plantas y el medio (Ammirato y Styer, 1985).

1.3.3 Ventajas y desventajas del uso de biorreactores:

Las ventajas del uso de biorreactores incluyen un incremento en la tasa de multiplicación, rápido crecimiento de las plantas, reducción en los costos del medio de cultivo, reducción en el gasto de energía, en el uso de mano de obra y en el uso de espacio (Levin et al., 1997).

La eliminación de agentes gelificantes reduce el costo de los medios de cultivo y la filtración de los mismos elimina la necesidad de autoclavado. Por otra parte la densidad de cultivo en medios líquidos es mucho mayor que en medios semisólidos, esto hace que el espacio necesario para su operación sea mucho menor. La reducción en espacio conlleva a una disminución en los requerimientos de energía para iluminación y refrigeración, lo cual en forma conjunta a la disminución de mano de obra hacen que los costos de operación sean menores (Levin et al., 1997).

Las desventajas de esta tecnología se relacionan a problemas asociados a la contaminación y la hiperhidricidad (Leifert y Waites, 1990; Leifert y Woodward, 1998; Leifert, 2000).

1.3.4 Modelos de biorreactores:

Varios diseños de biorreactores han sido desarrollados para un amplio rango de cultivos. Básicamente pueden dividirse en dos tipos, aquellos en que las plantas están inmersas parcialmente en el medio de cultivo y aquellos en que están inmersas permanentemente (Takayma, 1991).

1.3.4.1 Biorreactores de inmersión temporal

Este diseño es el más adecuado para el caso de materiales sensibles a la hiperhidricidad (Ziv, 1999; 2000). Existen tres tipos de biorreactores de inmersión parcial, los de fase gaseosa, los de capa líquida y los de inmersión temporal.

En los biorreactores de fase gaseosa, las plantas se sostienen en un soporte poroso y son asperjados intermitentemente con el medio de cultivo (Ushiyama, 1988) o expuestos a una neblina de nutrientes (Weathers et al., 1988). El exceso de medio es recolectado y recirculado. Este tipo de biorreactores otorga buen crecimiento y desarrollo de varios tipos de tejido aunque los sistemas de generación de la aspersión son difíciles de mantener.

En los biorreactores de capa líquida, las plantas están sujetas a una superficie que flota sobre el medio líquido del cual absorben nutrientes. En este caso solo la base del cultivo está en contacto con el medio. Un ejemplo de este sistema es el denominado Life Reaft[®] (Osmotek, 2002; Takayma, 1991).

Los biorreactores de inmersión temporal se caracterizan por poner al cultivo en contacto con el medio durante una duración e intervalos determinados. Debido a su construcción y operación simples, significan una alternativa de bajos costos. Un típico diseño de estos biorreactores consta de dos contenedores de plástico o vidrio donde uno contiene el medio líquido y el otro el cultivo a propagar (Adelberg y Simpson, 2002). Dentro de los biorreactores de inmersión temporal se destaca el sistema RITA[®], el cual está compuesto por dos compartimentos, uno superior donde se encuentran las plantas y uno inferior donde se deposita el medio de cultivo (Figura 1). Al inyectar aire con una bomba al compartimento inferior el medio de cultivo es impulsado hacia el que contiene las plantas, quedando estas inmersas en el medio líquido el tiempo que dure la inyección de aire (Etienne y Berthouly, 2002).

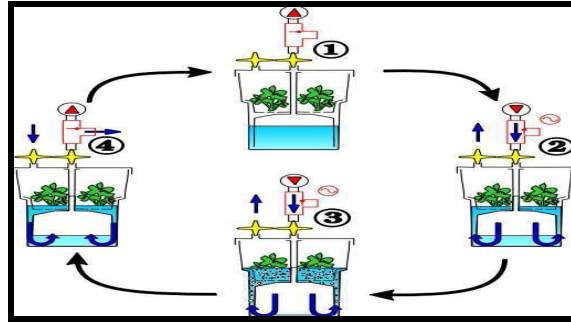


Figura 1: Esquema de un biorreactor tipo RITA®. Biorreactor en estado de reposo (1); comienza a ingresar aire al sistema (2); plantas inmersas en el medio de cultivo (3); el medio de cultivo desciende por gravedad a la recámara inferior (4).

1.3.4.2 Biorreactores de inmersión permanente

En este simple sistema el aire esterilizado por filtración es forzado hacia el interior del contenedor por su base, generando aireación y agitación del medio (Merchuk, 1990).

Estos biorreactores, también llamados biorreactores tipo airlift o biorreactores de columna de burbujas, son simples de operar y resultan una propuesta económica para la micropropagación de plantas (Levin et al., 1988; Levin et al., 1997).

1.4 Principal limitante de la multiplicación en biorreactores

1.4.1 Vitricificación:

Hiperhidricidad o vitricificación es el término propuesto para definir las malformaciones que frecuentemente se observan en plantas herbáceas y leñosas que se cultivan *in vitro* (Debergh et al., 1992).

Según Gaspar (1991) los tejidos hiperhidratados muestran una serie de características bioquímicas, anatómicas y morfológicas que los diferencian de los tejidos no vitricificados. Estas diferencias son explicadas a continuación:

- Bajo peso seco, explicado por mayor cantidad de agua ubicada principalmente en los espacios apoplásticos. Los niveles de agua intracelular son menos importantes (Kevers y Gaspar, 1986).
- Menos lignina que los tejidos sin síntomas de hiperhidratación. La baja lignificación viene asociada a la menor actividad de las enzimas involucradas en la síntesis de precursores de lignina y en su polimerización.

- Menos celulosa. Fenómeno asociado a la baja relación carbono-nitrógeno, favoreciendo a la síntesis de aminoácidos frente a la de azúcares para celulosa.
- Mayor actividad de la glutamato deshidrogenasa.
- Bajos contenidos de calcio. Bajas tasas de Ca^{+2} /ácido urónico, debido a los altos niveles de este último encontrado en las paredes celulares de tejidos vitrificados.
- Aspecto traslucido que podría estar explicado por un menor contenido de clorofila, a causa de la baja capacidad fotosintética.
- Bajos niveles de fenoles solubles.
- Mayor actividad de las peroxidasas, las cuales intervienen en el catabolismo de las auxinas. Por esto el transporte de esta hormona se ve reducido.
- Bajo Ca^{2+} , Mn^{2+} y Na^{+} y más K^{+} .

Los efectos visibles de la vitrificación se describen como una apariencia vítrea con brotes suculentos y un pobre sistema radicular (Paque y Boxus, 1987; Werker y Leshem, 1987; Ziv, 1991 a, 1995 a). Las hojas son los órganos que se muestran más afectados en el cultivo en medios líquidos. Desarrollan el tejido del mesófilo desorganizado, que generan un parénquima esponjoso con grandes espacios intercelulares (Werker y Leshem, 1987; Gaspar et al. 1987), un tejido vascular deformado y una epidermis anormal (Sutter, 1985; Ziv, 1991a).

La densidad de los cloroplastos aparece reducida en hojas de plantas vitrificadas, posiblemente a causa del gran tamaño de las células. También se observa un mayor espacio intercelular en el parénquima esponjoso en comparación con plantas sanas. En general las hojas de una planta vitrificada se ven con un mayor grosor y más voluminosas, con células epidérmicas más desarrolladas. El sistema vascular de las hojas hiperhidratadas se muestra menos desarrollado y tanto el xilema como las fibras del floema, menos lignificadas (Ziv, 1991a)

Bornman y Vogelmann (1984), propusieron que las marcadas diferencias en el tamaño de las células entre plantas afectadas por hiperhidricidad y plantas normales pueden ser explicadas por la difusión del agua hacia el interior de la célula. Otras referencias (Daguin y Letouze, 1983; Vieitez et al., 1985) enuncian una disminución en la lignificación de la pared celular de los tejidos vitrificados, lo cual resulta en un continuo alargamiento de los mismos.

Algunos de los problemas de deformación de los órganos de la planta, aparentemente son causados por la interrupción de las señales involucradas en la normal

secuencia de los eventos organizacionales existentes en el desarrollo de las plantas. Estos desordenes se manifiestan en mayor medida en la propagación en medios líquidos (Ziv, 1999).

La hiperhidricidad afecta la capacidad de las plantas de sobrevivir luego del trasplante a causa del mal funcionamiento de la actividad fotosintética y del fenómeno de transpiración (Preece y Sutter, 1991; Ziv, 1991a). Una posible solución es el uso de retardantes de crecimiento o inhibidores de la síntesis de giberelina que además de disminuir los efectos de la vitrificación, también reducirían el crecimiento de los brotes (Ziv 1990; Ziv y Shemesh, 1996).

Mediante el control del crecimiento de los brotes y suministrando de las condiciones adecuadas de cultivo, se han podido alcanzar buenos resultados en cuanto a tasas de crecimiento sin observarse los efectos de la vitrificación (Levin et al., 1988; Ziv 1990, 1991a, 1992a Takayama 1991; Takayama y Akita 1994; Ilan et al., 1995).

Generalmente, en sus etapas iniciales, el proceso de vitrificación es considerado como reversible, aunque no se conoce que hojas vitrificadas maduras puedan retroceder a estructuras normales y sobrevivir al trasplante. Por otro lado si se ha visto que brotes jóvenes vitificados repicados en medios de cultivo no vitrificantes o pasados a invernáculo, pueden regenerar estructuras normales. Por el contrario, si se efectúan sucesivos repiques a medios vitrificantes, pueden causarse severos daños que conduzcan incluso a la muerte de los meristemas primarios, lo que llevaría a la muerte de la planta (Gaspar et al., 1991).

Aunque muchas plantas pueden adaptarse a las condiciones de cultivo *in vitro*, el fenómeno de hiperhidricidad estuvo siempre considerado como una respuesta fisiológica a los simultáneos factores de estrés que se observan en este sistema de propagación, sumado a la alta humedad relativa que se encuentra en los contenedores donde se desarrollan las plantas y a la acumulación de dióxido de carbono y etileno que se encuentran en su atmósfera. (Ziv, 1991).

Mediante el uso de medios líquidos para la micropropagación de plantas, se promueve la absorción de nutrientes y el consecuente aumento en el crecimiento (Debergh, 1988; Aitken-Christie, 1991). Por otro lado, al prolongarse el período de contacto entre el medio y el cultivo se favorece la hiperhidricidad (Ziv et al., 1983).

Según Etienne, y Berthouly, (2001), la hiperhidricidad con sus serios efectos causados por el cultivo en medio líquido, pueden ser eliminados o controlados mediante el uso de sistemas de reinmersión temporal y el ajuste de los tiempos de inmersión. Un

aumento en la aireación en el contenedor de cultivo y el contacto intermitente entre el material vegetal y el medio de cultivo pueden reducir la aparición de hiperhidricidad y estas son dos características que se combinan en el sistema de inmersión temporal (Ziv et al., 1983).

1.4.2 Estrés oxidativo

1.4.2.1 Especies reactivas del oxígeno

Aunque el oxígeno atmosférico no es una especie reactiva, este puede ser transformado por sistemas metabólicos, en moléculas altamente reactivas. Estas especies químicas son conocidas como radicales libres y se caracterizan por presentar un electrón desapareado y por ser muy reactivas. De todos estos radicales libres resultan de gran interés las especies reactivas de oxígeno (ROS), debido a la estructura birradical de estas moléculas y al gran número de procesos que las generan y en los que pueden verse involucrado, dentro de los diversos procesos celulares.

Durante el metabolismo aerobio se generan pequeñas cantidades de ROS, incluyendo radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), anión superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), como respuesta a estímulos externos e internos. Estas mínimas concentraciones de ROS pueden ser indispensables en muchos procesos, como el sistema de señales intracelulares (que está relacionado con otros procesos como la proliferación celular y la apoptosis), la inmunidad, y la defensa contra microorganismos. Sin embargo, altas dosis o una eliminación ineficiente de ROS dan lugar a estrés oxidativo, que puede causar graves disfunciones metabólicas y daño a macromoléculas biológicas.

Una de las consecuencias del estrés oxidativo es la peroxidación lipídica, cuya prevención es esencial en todos los organismos aerobios, ya que los productos derivados de este proceso pueden interactuar con el ADN y son potencialmente mutagénicos. Los epóxidos formados pueden reaccionar espontáneamente con centros nucleofílicos en la célula o unirse a los ácidos nucleicos (Borsani et al., 2001).

Las principales ROS o sustancias prooxidantes son el hidroxilo, el peróxido de hidrógeno, superóxido, el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), el óxido nítrico (NO), el peróxido (ROO) la semiquinona (Q) y el ozono (O_3) (Del Río et al., 2003).

Según Venereo (2002), los radicales libres del oxígeno se clasifican de la siguiente manera:

1. Radicales libres inorgánicos o primarios. Se originan por transferencia de electrones sobre el átomo de oxígeno. Representan por tanto distintos estados en la reducción de éste y se caracterizan por tener una vida media muy corta. Estos son el anión superóxido, el radical hidróxilo y el óxido nítrico.
2. Radicales libres orgánicos o secundarios. Se pueden originar por la transferencia de un electrón de un radical primario a un átomo de una molécula orgánica o por la reacción de 2 radicales primarios entre sí. Poseen una vida media un tanto más larga que los primarios.
3. Intermediarios estables relacionados con los radicales libres del oxígeno. Aquí se incluye un grupo de especies químicas que sin ser radicales libres, son generadoras de estas sustancias o resultan de la reducción o metabolismo de ellas, entre las que están el oxígeno singulete, el peróxido de hidrógeno, el ácido hipocloroso, el peroxinitrito e hidroperóxidos orgánicos.

El H_2O_2 no es un radical libre, pero cae en la categoría de ROS por ser un compuesto intermediario e importante en la bioquímica de los radicales libres, ya que se descompone fácilmente en presencia de metales de transición (principalmente el Fe^{2+}) para producir el hidroxilo (Borsani et al., 2001).

El peróxido de hidrógeno puede difundirse rápidamente a través de las membranas celulares y desde ahí causar estrés oxidativo lejos de su sitio de formación. Aunque esta sustancia no es una especie altamente reactiva, algunas moléculas son directamente sensibles a esta, un ejemplo de esto son algunas proteínas que se ven afectadas frente a importantes niveles de peróxidos (Venereo, 2002).

1.4.2.2 Daño celular

Diferentes factores ambientales pueden generar ROS que causan daños oxidativos a las células vegetales. Estos factores incluyen la polución del aire, daños pos anóxicos, congelamiento por heladas, temperaturas extremas, alta intensidad de luz y períodos de sequía.

La sequía induce cambios fisiológicos como disminución en el potencial hídrico y cierre estomático que resulta en una baja disponibilidad de dióxido de carbono, favoreciendo a la reacción de Mehler, lo cual resulta en la generación de superóxido. También se induce la actividad de la glicolato oxidasa, generando peróxido de hidrógeno (Mittler y Zilinskas, 1994).

Las condiciones de estrés son capaces de promover la producción de ROS acelerando los procesos de senescencia. Un incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes durante los procesos de estrés ha sido reportado en muchos organismos. En las plantas, esta respuesta enzimática puede constituir una ventaja adaptativa en la protección frente al estrés oxidativo (Borsani et al., 2001).

La baja capacidad de destoxificación de los sistemas antioxidantes enzimáticos, asociada a la acumulación de peróxido de hidrógeno, llevaría a un aumento en la peroxidación de la membrana lipídica, causando la ocurrencia de explantos vitrificados (Diamantidis et al., 2006).

El daño celular producido por las especies reactivas del oxígeno ocurre sobre diferentes macromoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos

1. *Lípidos*. Es aquí donde se produce el daño mayor en un proceso que se conoce como peroxidación lipídica, afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados, ya que se altera la permeabilidad de la membrana celular y se produce muerte celular. La peroxidación lipídica o enranciamiento oxidativo representa una forma de daño hístico que puede ser desencadenado por el oxígeno, el oxígeno singulete, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Los ácidos grasos insaturados son componentes esenciales de las membranas celulares, por lo que se cree son importantes para su funcionamiento normal, sin embargo, son vulnerables al ataque oxidativo iniciado por los radicales libres del oxígeno (Venereo, 2002).

2. *Proteínas*. Hay oxidación de un grupo de aminoácidos como fenilalanina, tirosina, histidina y metionina; además se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas, y por último hay formación de grupos carbonilos (Venereo, 2002).

3. *Ácido desoxirribonucleico (ADN)*. Ocurren fenómenos de mutaciones y hay pérdida de expresión o síntesis de una proteína por daño a un gen específico, modificaciones oxidativas de las bases, delecciones, fragmentaciones, interacciones estables ADN-proteínas, reordenamientos cromosómicos y desmetilación de citosinas del ADN que activan genes (Venereo, 2002).

Los lípidos son las principales biomoléculas blanco de las ROS en la membrana, en especial los ácidos grasos poliinsaturados, quienes representan entre el 50 y el 90 % de los lípidos de la membrana. La peroxidación de los lípidos afecta la integridad de la estructura de la membrana y altera sus funciones, llevando a la lisis celular. Cuando los ácidos grasos poliinsaturados son oxidados, se forman aldehídos reactivos que causan daños. El malondialdeído (MDA) es una molécula altamente reactiva y tóxica que al

unirse a los ácidos nucleicos y proteínas causan modificaciones que alteran las funciones biológicas.

La formación de MDA, un producto final secundario de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados, es considerado un útil indicador de los niveles de peroxidación lipídica. Un método práctico de medición de estos MDA, está referido a la reacción con las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Esta técnica, aunque con algunas limitaciones, es de baja complejidad y rapidez, por lo que se considera como el método de elección en estudios de peroxidación lipídica. Los TBARS son productos formados como resultado de la peroxidación lipídica inducida por los radicales libres (Leonard et al., 2010).

1.5 Estrategias para superar los daños resultantes de la vitrificación

1.5.1 Antioxidantes

Una baja defensa antioxidante enzimática y no enzimática, conjuntamente con un aumento de ROS, llevaría a un estrés oxidativo en un explanto y llevaría a que este presente síntomas de vitrificación (Diamantidis et al., 2006).

Un antioxidante es una entidad química que a bajas concentraciones, en comparación con el oxidante, retarda o previene la oxidación de un sustrato incluyendo lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ADN.

Dentro de los antioxidantes podemos destacar a las enzimas antioxidantes intracelulares superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT). Además existen diversos componentes celulares como glutatión reducido y las vitaminas antioxidantes A, C y E (Hauptmann y Cadenas, 1997).

Esta reacción de dismutación catalizada por la SOD mantiene normales los niveles de superóxido intracelular y algunos autores han implicado a esta enzima en la protección de la célula del estrés oxidativo (Borsani, et al., 2001).

En condiciones fisiológicas, estos mecanismos de defensa mantienen una baja concentración de ROS en la célula y su actividad es muy precisamente regulada, de aquí que el equilibrio entre la producción de ROS y las defensas antioxidantes determina el grado de estrés oxidativo. En ésta regulación, la SOD se encarga de dismutar al superóxido abstrayendo un electrón para producir peróxido de hidrógeno. El segundo paso es la reducción del peróxido de hidrógeno a agua por medio de glutatión peroxidasa (GPX),

ascorbato peroxidasa (APX), o CAT, pero en presencia de metales de transición, como el Fe^{2+} , se cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno a hidroxilo por medio de la reacción de Fenton. Un desequilibrio entre estos procesos el primer y segundo paso tiene el potencial resultado de incrementar los niveles de peróxido de hidrógeno e hidroxilo intracelular, provocando senescencia celular (Sánchez-Rodríguez, 2004).

Las ROS pueden ser eliminadas por los sistemas antioxidantes pero cuando la intensidad y duración del tratamiento superan la barrera antioxidante, se produce un exceso de ROS que se traduce en daño oxidativo a membranas y proteínas. Los daños a membranas van acompañados de un incremento en la síntesis de etileno y ácido jasmónico, que junto con el peróxido de hidrógeno van a regular la expresión de un gran número de proteínas de defensa (HSPs, quitinasa o antioxidantes, entre otras) (Rodríguez-Serrano et al., 2008).

1.5.1.1 SOD

Descrita por McCornrd y Fridovich (1969), constituye la primera fase de defensa antioxidante, cataliza la reacción de eliminación del radical superóxido mediante su transformación en peróxido de hidrógeno, el cual puede ser metabolizado por las enzimas CAT, APX o GPX.

El incremento de la actividad SOD contribuye a la destoxificación a través de la transformación del anión superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. La SOD juega un rol fundamental en la defensa celular contra las ROS y se ha visto que el estrés oxidativo induce al aumento de la actividad de las SOD. Se han identificado cuatro clases de SOD, una de ellas contiene un cofactor con dos átomos metálicos, uno de Cu y otro de Zn. Las demás presentan cofactores mononucleares de Fe, Mn o Ni. FeSODs y MnSODs presentan homologías en cuanto a sus secuencias y estructura tridimensional (Kanematsu et al., 2010). Generalmente Cu-Zn SOD son isoformas ubicadas en el citosol y cloroplastos, mientras que Mn-SOD se encuentra en la mitocondria y Fe-SOD en los cloroplastos (Costa Galvão et al., 2005).

Si bien la inducción de la SOD por diferentes tipos de estreses ambientales ha sido reportada por varios autores, su rol como parte del mecanismo de protección en situaciones de estrés, está aún en discusión. Por otro lado investigaciones mediante el uso de plantas transgénicas han mostrado que las plantas que presentan una sobreexpresión de la actividad de la SOD, son mas tolerantes a diferentes condiciones de estrés (Borsani et al., 2001).

1.5.1.2 CAT

La acción de la CAT en plantas fue observada por primera vez en 1818 por Thenard, quien notó que estos tejidos degradaban rápidamente el peróxido de hidrógeno, sustancia que él descubriera algunos años antes. Estas catalasas pueden existir en múltiples formas y ser codificadas por múltiples genes en diferentes organismos (Guan et al., 1997). El peróxido de hidrógeno producido en condiciones de estrés, es transformado en agua por medio de la CAT y la APX (Guan et al., 1997). Esta es una enzima que se encuentra en todos los organismos aerobios degradando al peróxido de hidrógeno y realiza una de las catálisis más activas de la naturaleza. La velocidad de la degradación de los peróxidos va a depender de la concentración de estos. A altas concentraciones de sustrato, la CAT degrada al peróxido de hidrógeno a velocidades extremadamente rápidas usando la reacción catalítica en donde el peróxido actúa con una doble función de dador y aceptor de moléculas de hidrógeno.

La actividad de la enzima crece linealmente en relación al rango de concentración del peróxido de hidrógeno y mantiene regulada la concentración intracelular de este. Organismos con altas concentraciones de CAT tienen bajos niveles de peróxido de hidrógeno endógeno y a su vez cuando hay altos niveles de este, la actividad de la enzima también aumenta (Guan et al., 1997).

En un estudio comparativo del sistema antioxidante entre plantas vitrificadas y no vitrificadas de *Populus suaveolens*, se observó en las primeras, baja actividad CAT, peroxidasa, APX, GPX y fenilalanina amonio liasa, durante el período de cultivo Lin et al. (2004). Estos autores encontraron que el aumento en la actividad SOD conjuntamente con la baja de la actividad CAT y peroxidasa, así como de las otras enzimas involucradas en el ciclo del ascorbato–glutación, estarían estrechamente correlacionados con la acumulación de peróxido de hidrógeno. Se concluyó que la baja capacidad de destoxificación del sistema enzimático antioxidante, asociada a la acumulación de peróxido de hidrógeno, llevaría a un aumento en la peroxidación de la membrana lipídica, causando la ocurrencia de explantos vitificados. Similares resultados fueron observados en el cultivo *in vitro* del portainjerto de manzano MM106, con aumentos en la concentración de peróxido de hidrógeno frente a una disminución de la actividad de la CAT (Diamantidis et al., 2006).

1.5.1.3 Ácido ascórbico

En las células vegetales, el ácido ascórbico participa en diferentes procesos involucrados en el crecimiento y el metabolismo de la misma, es un componente clave en el sistema antioxidante de las plantas, además de jugar un importante rol en otros procesos fisiológicos (Wolucka y van Montagu, 2003; Agius et al., 2003; Agius et al., 2006).

Las principales actividades biológicas en las que participa el ácido ascórbico dentro de la célula vegetal son interviniendo como cofactor de enzimas, actúan como fotoprotectores y como donadores/dadores en las reacciones de transferencias de electrones en la membrana plasmática o en los cloroplastos. Como resultado de estas actividades, el ácido ascórbico participa en una variedad de procesos, como fotosíntesis, fotoprotección, crecimiento de la pared celular, elongación celular y resistencia diferentes estreses ambientales (Smirnoff y Wheeler, 2000; Davey et al., 2000).

Antioxidantes de bajo peso molecular, como el ácido ascórbico, interactúan directamente con las ROS actuando como removedores de estas especies (Nagata, et al., 2003). Como antioxidante, el ácido ascórbico actúa neutralizado al ión superóxido o al ión hidroxilo. Por otro lado, actúa como cofactor de la enzima APX (Smirnoff, 2000).

Los cloroplastos son, en la célula vegetal, el principal lugar de síntesis de ROS y aquí el ácido ascórbico actúa de manera clave como agente protector frente a los efectos del estrés oxidativo, modulando en procesos como la lignificación, división celular y en la respuesta de la planta frente a ataques de patógenos (Davey et al., 2000; Pastori et al., 2003). Además actúa en los cloroplastos protegiendo al tocoferol, previniendo la la formación del ión hidroxilo durante el estrés oxidativo y regenerando al tocoferol en la membrana de los tilacoides (Munné y Alegre, 2002).

Resultados positivos fueron observados al agregar vitamina C en protocolos de criopreservación, para la reducción de la peroxidación lipídica y sugieren que puede ser beneficiosa su adición para otros protocolos (Leonard et al., 2010).

1.5.1.4 Ácido cítrico

Los ácidos orgánicos, como el ácido cítrico, actúan como buffer en el medio de cultivo, encontrándose que el agregado de estos, o sus sales de sodio o potasio, estabilizan el pH de medios para cultivo in Vitro.

Estos ácidos orgánicos se encuentran en el xilema de las plantas, donde, junto con los aminoácidos, forman complejos con iones metálicos y ayudan a su transporte. Estos ácidos

orgánicos pueden ser, además, secretados por las células y tejidos cultivados, contribuyendo a esta función en el medio (George, 1993).

Por otro lado, el ácido cítrico posee una fuerte habilidad para formar quelatos de hierro con el ión Fe^{2+} , manteniéndolo en solución y retardando la reacción de Fenton (Li et al., 2005).

Normalmente el peróxido de hidrógeno tiene una baja actividad oxidativa, sin embargo, bajo condiciones de pH entre valores de 3 y 5, la presencia del ión Fe^{2+} disocia al peróxido a formas inestables y altamente tóxicas como el ión hidroxilo mediante la reacción de Fenton (Walling, 1975; Sun y Pignatello, 1992):



1.5.2 Floroglucinol

El floroglucinol es usado para prevenir la hiperhidricidad en la micropropagación de explantos por su participación en la biosíntesis de lignina, proveyendo de sus precursores en tejidos vitrificados que no la sintetizan o lo hacen a bajos niveles (Figura 2). Ciertas enzimas clave en la síntesis de la lignina muestran una significativa menor actividad en plantas vitrificadas y el agregado de floroglucinol al medio de cultivo en la propagación de manzanos, previniendo la ocurrencia de hiperhidricidad al aumentar la actividad de las enzimas participantes en la síntesis de lignina (George, 1993).

Resultados positivos fueron observados también en cultivos de arándanos (Ross et al., 2009), donde la adición de floroglucinol al medio de cultivo, previno la ocurrencia de brotes vitrificados y determinó mayores tasas de multiplicación.

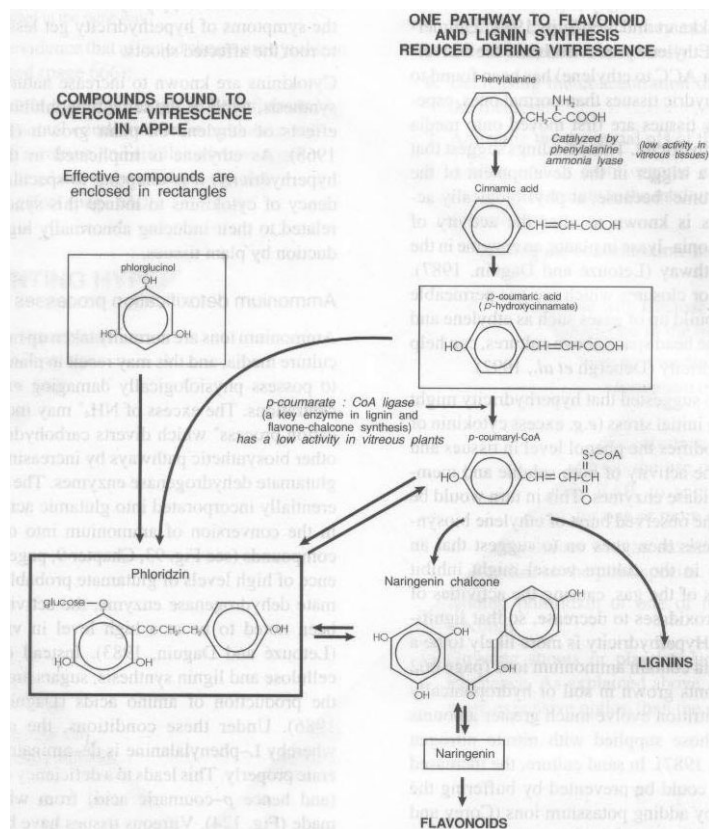


Figura 2. Vía de síntesis de lignina y sitio de acción del floroglucinol. Tomado de George, 1993.

1.6 Material vegetal

Dentro del grupo de especies leñosas se escogieron para el desarrollo de este trabajo, una de uso forestal, el *Eucalyptus grandis*, y otra de uso frutícola, que es el caso del portainjerto *Malus domestica* M9 el cual se utiliza como pie para injertar diferentes variedades de manzana. Los argumentos para utilizar estos materiales fueron comerciales y productivos, ya que en ambos casos se trata de genotipos de calidad comprobada y adecuada adaptación a las condiciones edafoclimáticas del Uruguay. Por estos motivos representan, cada uno en su rubro, un material de interés comercial para el país.

1.6.1 Portainjerto M9

El M9 ha sido durante años el prototipo del portainjerto enanizante, con características favorables como precocidad, eficiencia productiva, calidad de fruta y cierta

resistencia a pudrición de cuello, por eso ha sido utilizado en la mayoría de las plantaciones de alta densidad. Este portainjerto presenta entre el 30 y el 40 % del vigor de un pie franco o de semilla (Gil, 2000).

1.6.1.1 Producción de manzana en el Uruguay

En la figura 3 se ve la evolución de la superficie ocupada por plantaciones de manzanos, el número de plantas totales y el número de plantas por hectárea para la serie de datos 2001-2010. Aquí puede observarse una clara tendencia al aumento de la densidad de plantas por hectárea en los últimos años, lo cual implica, entre otras cosas, la incorporación de portainjertos enanizantes como el M9.

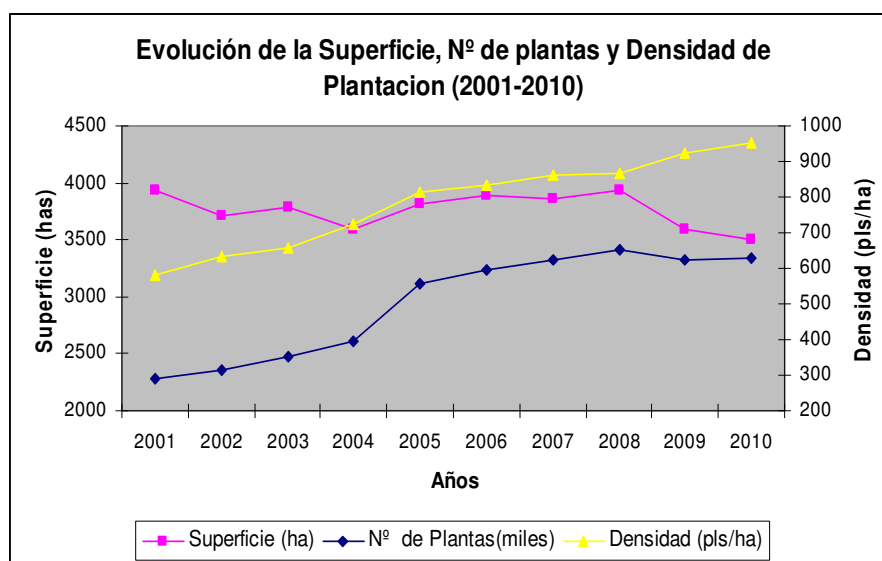


Figura 3. Evolución del cultivo de manzano en el período 2001-2010. Fuente: MGAP-DIEA

1.6.1.2 Micropropagación de portainjertos de manzano en medio líquido

Estudios realizados en la micropropagación de plantas vía organogénesis o embriogénesis somática automatizando el proceso con biorreactores, mostraron menores costos en la producción dado la menor labor realizada en la propagación de plantas, tanto en biorreactores de inmersión permanente como temporal (Paek et al., 2005). Un protocolo de propagación masiva *in vitro* para portainjertos M9 de manzano fue desarrollado por Chakrabarty et al., (2003), utilizando un sistema automatizado y de bajo costo con biorreactores. En dicho ensayo se realizaron estudios comparativos entre cultivo en medio

semisólido y el uso de biorreactores de inmersión temporal y permanente. Uno de los resultados observados fue una mayor proliferación y un crecimiento más eficiente de las plantas crecidas en biorreactores de inmersión continua, aunque también se pudo ver en estos un mayor número de brotes afectados por la hiperhidricidad. Los autores sugirieron un mejor ajuste en las frecuencias de inmersión del cultivo en el medio para mejorar la tasas de multiplicación sin aumentar las el número de brotes vitrificados.

Chakrabarty et al. (2003) estudiaron la dinámica de la utilización de los nutrientes y varios parámetros fisiológicos y de crecimiento durante la proliferación *in vitro* del portainjerto M9 en biorreactores de inmersión permanente y continua. Dentro de los resultados obtenidos se observó que los brotes individuales crecidos en el sistema de inmersión temporal tenían mayores índices de materia seca y en general eran de mayor calidad que los obtenidos en el sistema de inmersión permanente. Si bien las plantas de manzano crecidas en biorreactores de inmersión permanente mostraron una mayor utilización de los nutrientes, el crecimiento de los brotes fue limitado por la eficiencia del fosfato y el nitrógeno. Las plantas producidas bajo el sistema de inmersión temporal, en comparación con el sistema de inmersión continua, mostraron mayores tasas fotosintéticas y una baja pero continua tasa de absorción de nutrientes. También se demostró que un alto nivel de enzimas antioxidantes presentes en plantas desarrolladas en el sistema de inmersión continua indujeron a cambios fisiológicos como una respuesta de adaptación al estrés.

El uso de biorreactores puede significar una eficiente y económica herramienta para la masiva propagación clonal de plantas si los problemas técnicos son solucionados. Se establecieron ensayos utilizando portainjertos de manzano creciendo en medio líquido mediante el sistema de biorreactores tipo RITA[®] de inmersión temporal con el fin de optimizar las condiciones de operación. Se testearon diferentes tamaños de explantos, diferentes concentraciones de reguladores decrecimiento (BAP, KIN e IBA) en las fases de multiplicación y elongación y el cambio de medio de cultivo durante la fase de elongación. Los resultados mostraron que el mayor requerimiento de citoquininas se dio durante la fase de multiplicación, mientras que bajas concentraciones fueron mejores durante la fase de elongación. Por otro lado se observó mayor porcentaje de vitrificación a medida que aumentaba la concentración de citoquininas en ambas fases del desarrollo. La mayor producción de brotes en términos de número y calidad, se obtuvo utilizando 4.4 μmol de BAP y 0.5 μmol de IBA durante la fase de multiplicación y 1.1 μmol de BAP 0.25 μmol de IBA durante la fase de elongación. El cambiar dos veces de medio durante la

elongación, resultó en una mayor producción de los brotes en comparación con la situación de no cambiarlo, aunque también resultó en una mayor incidencia de la vitrificación. Otro resultado observado fue la mayor tasa de multiplicación y mayor elongación de los explantos al tener una frecuencia de inmersión de 16 veces por día en comparación con 8 veces por día. Por último, en relación al tamaño de los explantos, se observó una mayor y significativa tasa de producción de brotes cuando se trataba de segmentos de entre 0.5 y 1 cm en comparación con 1.5 cm. Por otro lado, la elongación y el porcentaje de vitrificación no se vieron afectados por el tamaño de los explantos (Department of Crop Science, Swedish University of Agricultural Sciences, 2006).

1.6.2 Eucalipto

La importancia de esta especie radica en el incremento anual que presentan estos cultivos y por este motivo se destacan principalmente, dentro de los cuales se destaca el *E. grandis*.

1.6.2.1 Importancia del eucalipto en Uruguay

El área forestada en Uruguay ha mostrado un fuerte desarrollo en las últimas décadas, multiplicándose más de 15 veces desde el año 1988 a la fecha. De un total de 45 mil hectáreas forestadas entre 1975 y 1988, pasan a registrarse más de 960 mil hectáreas, (DGF-MGAP, 2010). Según el Censo General Agropecuario del año 2000, casi el 72% de las plantaciones forestales se desarrollaron bajo proyecto, esto es, en el marco de las leyes de promoción forestal. De acuerdo a este censo la tasa promedio anual de forestación es casi de 50 mil hectáreas por año, con un registro máximo en el año 1998 de 83 mil hectáreas plantadas (Figura 4).



Figura 4. Evolución de la superficie forestada bajo proyecto (Dirección General Forestal, 2006).

1.6.2.2 Micropropagación de eucaliptos en medio líquido

El empleo de técnicas biotecnológicas en la propagación de eucalipto ha permitido la introducción de numerosos clones de interés con mayor facilidad, aunque los costos de estas tecnologías aún resultan la mayor limitante para su uso masivo. Frente a esta situación, el uso de biorreactores ha mostrado muy buenos resultados en diversas especies, entre ellas eucalipto (Palhares et al., 2004).

Dentro del programa de biotecnología de Mondi Forests (Sudáfrica), se comparó el cultivo de seis clones de eucalipto con el uso de biorreactores de inmersión temporal (RITA®) y micropropagación en medio semisólido. En general las plantas producidas en los biorreactores fueron más rústicas y se comportaron mejor en la fase de aclimatación que las crecidas en medio semisólido. Los ciclos de multiplicación en los RITA® fueron entre 14 y 18 días comparados con los 25- 28 días del ciclo del medio semisólido. Otros resultados obtenidos en este trabajo fueron la menor presencia de callos en hojas y la base de brotes y el mejor desarrollo radicular de las plantas cultivadas en biorreactores (Mc. Alister et al., 2005).

Plantas de *E. urograndis* fueron utilizadas con el objetivo de incrementar la calidad de los explantos en biorreactores de inmersión temporal y estudiar el efecto de la talla de las de estos explantos en el proceso de aclimatación. Los resultados mostraron que los mayores niveles de sobrevivencia (63%) fueron logrados por las explantos de entre 1,1 y 2

cm de longitud. Estas plantas a su vez mostraban mejor desarrollo de hojas y emisión de raíces (Palhares et al., 2004).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

El objetivo planteado para esta tesis es mejorar la tasa de multiplicación en medio líquido para propagar *in vitro* masivamente plantas leñosas de interés comercial.

2.2 Objetivos específicos

Para el cumplimiento del objetivo general se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Ajustar los aspectos operativos de los biorreactores y los componentes de los medios de cultivo.
- Evaluar la relación entre la vitrificación y la respuesta antioxidante para determinar estrategias que permitan superar esta limitante.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 material a propagar

Se trabajó con dos especies leñosas de interés comercial dentro de los rubros frutícola y forestal respectivamente. El material vegetal usado fue el clon específico de portainjerto M9 de *Malus domestica* y *Eucalyptus grandis*.

Las plantas del portainjerto M9, fueron suministradas por INIA Las Brujas y forman parte del stock de plantas con que cuenta el Laboratorio de Biotecnología de la mencionada estación experimental. Las plantas de eucalipto fueron provistas por INIA Tacuarembó y se trató de un clon no específico proveniente de una prueba de progenie de árboles procedentes de Sudáfrica, seleccionado por su comportamiento productivo.

3.2 Medios de cultivo

3.2.1 Portainjerto M9

Para la micropropagación del portainjerto M9 se usó un medio de cultivo con las sales DKW (Driver y Kuniyuki, 1984), vitaminas Staba (Staba, 1969) y 0.8 mg/L de bencil amino purina (BAP). Como fuente de carbono se usó 3% de sacarosa, para solidificar el medio se agrogó 6 g/L de agar y el pH se ajustó a 5.8 (Cuadro 1).

Para ajustar la concentración de sales minerales y de reguladores de crecimiento a utilizar en el medio líquido, se tomaron como base los medios de cultivo sólidos que se emplean para propagar ambos materiales. A partir de ellos y considerando la mayor eficiencia de absorción de nutrientes en los medios líquidos, se propusieron diferentes diluciones para evaluar la combinación que mejor se ajustara a los parámetros de calidad y producción de las plantas.

La propuesta realizada para el caso del medio de cultivo utilizado para el portainjerto de manzana, fue diluir la concentración salina y de reguladores de crecimiento a un cuarto de la concentración original usada en la propagación con medio semisólido.

3.2.2 Eucalipto:

Con respecto al medio de cultivo semisólido en el que se propagó el eucalipto, este está compuesto por las sales WPM (Lloyd y Mc Cown, 1981), vitaminas Fossard (Fossard,

1976), 0.1 mg/L de BAP, 0.01 mg/L ácido naftalenacético (NAA), sacarosa 1 %, 6 g/L de Agar y pH 5.8 (Cuadro 2).

Cuadro 1. Medio de cultivo sólido y líquido para portainjertos M9.

		Medio sólido (mg/L)	Medio líquido (mg/L)
Macro minerales DKW	NH ₄ NO ₃	1416	354
	CaCl ₂	109	27.25
	CaNO ₃	1367	341.75
	KH ₂ PO ₄	258	64.5
	K ₂ SO ₄	1560	390
	MgSO ₄	383	95.75
Micro minerales DKW	H ₃ BO ₃	12.4	3.1
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.05	0.0125
	MnSO ₄ .H ₂ O	32	8
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.5	0.125
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	21.2	5.3
	KI	1.6	0.4
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.05	0.0125
	FeSO ₄ Na EDTA	36.7	9.175
Vitaminas Staba	Mioinositol	200	50
	Biotina	1	0.25
	Piridoxina	2	0.5
	Tiamina	2	0.5
	BAP	0.8	0.2
pH		5.8	5.8
Agar		6000	---
Sacarosa		30	7.5

Para el caso de la propagación del eucalipto en medio líquido, se realizó una etapa previa a la instalación del ensayo en la cual se hicieron pruebas con diferentes concentraciones salinas y de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, con el fin de determinar una combinación de componentes que mostrara resultados que pudieran ser analizados con criterios estadísticos.

Partiendo de esto, se determinó trabajar con una concentración salina diluida a la mitad en relación a la utilizada en la propagación en medio semisólido y 1/10 de la concentración de los reguladores de crecimiento.

3.3 Sistemas de propagación

Los dos materiales vegetales se propagaron en sistemas de propagación en medio líquido, de inmersión temporal tipo RITA[®] y biorreactores de inmersión permanente (BIP) y en medio semisólido. Ambos tipos de biorreactores se evaluaron comparativamente, proponiéndose además, diferentes tiempos de inmersión para el caso de los de inmersión temporal.

Cuadro 2. Medio de cultivo sólido y líquido para eucalipto.

		Sólido (mg /L)	Líquido (mg/L)
Macro minerales	NH ₄ (NO ₃)	648,5	324,3
	KH ₂ PO ₄	132	66
	MgSO ₄	170	85
	KNO ₃	445	222,5
	MgCl ₂	275,5	137,8
	Ca Cl ₂ . 2H ₂ O	338,6	169,3
	Ca (NO ₃) ₂	212,6	106,3
Micro WPM	H ₃ BO ₃	6,2	3,1
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25	0,125
	MnSO ₄ .H ₂ O	22,3	11,15
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,125
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	4,3
	Fe SO ₄ .7 H ₂ O	278,4	139,2
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	379,2	189,6
Vitaminas Fossard	Ac nicotínico	5	2,5
	Piridoxina	1,3	0,65
	Tiamina	13,5	6,75
	Pantotenato de Calcio	2,5	1,25
	Ac. Ascorbico	1,8	0,9
	Glicina	3,5	1,75
	Biotina	0,25	0,125
	Cisteína	21	10,5
BAP		0,1	0,01
NAA		0,01	0,001
pH		5,8	5,8
Agar		6000	---
azúcar		10000	5000

3.3.1 Sistema RITA[®]

Se emplearon RITA[®] con una capacidad de 0,5 L de medio de cultivo. El medio toma contacto con las plantas que se alojan en una recámara superior de igual volumen, cuando es desplazado al ingresar aire al primer compartimiento.

El aire ingresado pasa por un filtro Midisart[®] 2000 de 0,2 µm PTFE y es impulsado por una bomba marca IKAWI, modelo AP 115, con un flujo máximo de 15 L/min y una presión máxima de 1.0 kg/cm² (Figura 4). Para todos los casos el volumen de medio utilizado fue de 250 mL y el número de plantas cultivadas fue de 8 por contenedor.

Las frecuencias de inmersión se controlaron mediante un timer que mantuvo las plantas en contacto con el medio de cultivo durante 1 min, una cantidad de veces al día tal y como se especifica en cada ensayo.

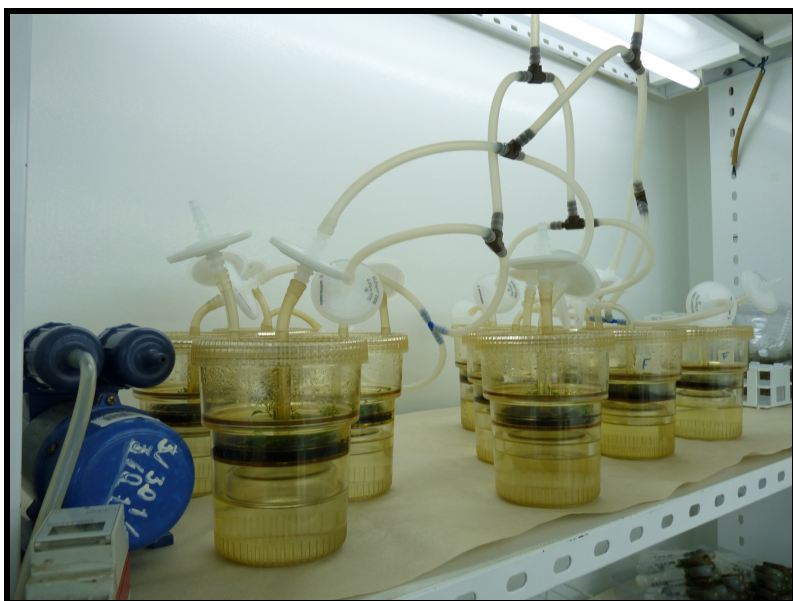


Figura 4. Reactores de inmersión temporal RITA®.

Las condiciones de cultivo de la cámara de crecimiento donde se cultivaron los explantos, fueron de 20 °C de temperatura ambiente, un período de luz de 16 horas suministrada por tubos de luz fría con una intensidad de $35 \mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ y 8 horas de oscuridad.

3.3.2 Biorreactores de inmersión permanente

El sistema de inmersión permanente se llevó a cabo en recipientes de dos litros de capacidad, con tapones de silicona que cuentan con puertos de entrada y salida de aire filtrado mediante un filtro de disco Midisart® 2000 de $0,2 \mu\text{m}$ PTFE (Figura 5). En todos los ensayos, el volumen utilizado fue de 500 mL por recipiente y diez plantas en cada uno de ellos.

El tubo de entrada de aire posee un difusor tipo piedra porosa que genera el burbujeo en el medio. La aireación fue proporcionada por una bomba de pecera con un caudal constante de aire de 2 L/min.

Las condiciones de cultivo en la cámara de crecimiento donde se cultivaron los explantos en los BIP fueron las mismas que las usadas para los reactores de inmersión permanente.



Figura 5. Reactores de inmersión permanente.

3.4 Parámetros evaluados

Para ambos materiales vegetales se propusieron estrategias de propagación para ajustar la mejor combinación de variables de ambos sistemas de crecimiento. Se planteo también, el uso de ácidos orgánicos y antioxidantes en diferentes concentraciones. Para todos los casos los parámetros evaluados fueron grado de proliferación y el desarrollo de las plantas.

3.4.1 Portainjerto M9

3.4.1.1 Variables que intervienen en el proceso de crecimiento en biorreactores

Para evaluar la incidencia de las variables en el proceso, se propusieron diferentes frecuencias de inmersión en la operación del biorreactor tipo RITA[®] y un volumen de medio en el sistema de inmersión permanente, que permitiera un adecuado desarrollo de las plantas cultivadas y que a su vez fuera suficiente para completar el ciclo de crecimiento de las mismas.

Para la proliferación de los portainjertos de manzano se utilizaron los biorreactores de inmersión temporal RITA[®] y los BIP.

Para los primeros se propuso un primer ensayo con las siguientes características:

- Número de contenedores: 10
- Frecuencia de las inmersiones: 1 cada 3 horas
- Duración de las inmersiones: 1 min

Una vez recogidos los resultados de esta primera prueba, se procedió a realizar un segundo ensayo variando la frecuencia de las inmersiones:

- Número de contenedores: 10
- Frecuencia de las inmersiones: 1 cada 8 horas
- Duración de las inmersiones: 1 min

Para el caso de los BIP, desde el punto de vista de los aspectos operativos, se propuso trabajar con cuatro contenedores y 500 mL de medio de cultivo por contenedor.

3.4.1.2 Evaluación de proliferación y grado de vitrificación

Para determinar la tasa de proliferación de las plantas, se registró el número de nuevos explantos generados en el período de crecimiento planteado para el ensayo. En este momento se determinó, además, el grado de vitrificación de las plantas, estimándose el porcentaje y la intensidad de la afección.

3.4.1.3 Estrategias para superar los efectos de la vitrificación

Además de las estrategias operativas se manejaron dos concentraciones de floroglucinol, de 40 y 80 mg por litro de medio de cultivo.

En el cuadro 3 se resumen los tratamientos, tanto para los biorreactores de inmersión temporal como para los permanentes. En el cuadro 4 figuran las concentraciones de ácido cítrico y de ácido cítrico con ácido ascórbico usadas.

3.4.2 Eucalipto

Para el caso del eucalipto también se propusieron tratamientos que optimizaran el desarrollo y la proliferación de las plantas y se evaluó el comportamiento de las mismas.

Cuadro 3. Tratamientos con floroglucinol.

<i>Sist. De propagación</i>	<i>Volumen de medio (mL)</i>	<i>de Floroglucinol (mg/L)</i>	<i>Aireación</i>
RITA	250	0	1 min / 3 h
RITA	250	40	1 min / 3 h
RITA	250	40	1 min / 8 h
RITA	250	0	1 min / 8 h
BIP	500	0	24 h
BIP	500	40	24 h
BIP	500	80	24 h

Cuadro 4. Concentraciones de ácido cítrico y ácido ascórbico.

<i>Sist. De propagación</i>	<i>Volumen de medio (mL)</i>	<i>Ac. Cítrico (mg/l)</i>	<i>Ac. Ascórbico (mg/l)</i>	<i>Aireación</i>
RITA	250	0	0	1 min / 8 h
RITA	250	50	0	1 min / 8 h
RITA	250	100	0	1 min / 8 h
RITA	250	100	100	1 min / 8 h
BIP	500	0	0	24 h
BIP	500	100	0	24 h
BIP	500	100	100	24 h

3.4.2.1 Variables que intervienen en el proceso de crecimiento en biorreactores

En el caso del eucalipto, al igual que con el manzano, se realizaron pruebas con los biorreactores de inmersión permanente y los de inmersión temporal.

Se tomaron como base los datos obtenidos a partir de la experiencia de propagación con los portainjertos de manzana y se determinó el siguiente protocolo de propagación con los RITA[®]:

- Número de contenedores: 10
- Frecuencia de las inmersiones: 1 cada 3 horas
- Duración de las inmersiones: 1 min

Para el caso del ensayo con los BIP, también se utilizaron como base los resultados obtenidos con la propagación de los portainjertos de manzana y se planteó un experimento con 4 contenedores de 500 mL de medio de cultivo.

3.4.2.2 Evaluación de proliferación y grado de vitrificación

Para evaluar el grado de proliferación de las plantas de eucalipto y el nivel de vitrificación de las mismas, se procedió del mismo modo que con los portainjertos de manzano, contando los nuevos explantos generados a partir de cultivados inicialmente y determinando el porcentaje de plantas vitrificadas. El período de crecimiento de las plantas dentro de los biorreactores, fue de un mes.

3.4.2.3 Estrategias para superar los efectos de la vitrificación

Al momento de instalar los ensayos de propagación de los eucaliptos, se propuso el agregado de Floroglucinol al medio de cultivo, tal y como se hizo para el caso de los portainjertos de manzano. De esta manera, se plantearon los siguientes tratamientos para ambos sistemas de biorreactores (cuadro 5).

Cuadro 5. Tratamientos de multiplicación de plantas de eucalipto.

<i>Sist. De propagación</i>	<i>Volumen de medio (mL)</i>	<i>Floroglucinol (mg/L)</i>	<i>Aireación</i>
RITA	250	0	1 min / 3 h
RITA	250	40	1 min / 3 h
BIP	500	0	24 h
BIP	500	40	24 h

3.4.2.4 Repique de las plantas al medio sólido

Una vez evaluados los resultados del desarrollo de las plantas de eucaliptos en los biorreactores de inmersión permanente, estas fueron repicadas a medio sólido para evaluar su comportamiento y desarrollo en esas condiciones, luego de haber pasado por el medio de cultivo líquido.

El objetivo perseguido con esta evaluación fue constatar como influye la propuesta de incluir una etapa de multiplicación en medio líquido dentro de un protocolo de propagación tradicional en medio sólido, tanto desde el punto de vista del crecimiento de las plantas como de la calidad de las mismas. Para esto se evaluó el desarrollo de estas plantas mediante el registro de la tasa de multiplicación de las matas, la elongación máxima alcanzada y el peso fresco de cada una.

3.5 Parametros metabólicos y fisiológicos

Como parte del trabajo se planteó la medición de determinados parámetros metabólicos y fisiológicos de manera de buscar explicaciones a las diferencias entre plantas desarrolladas normalmente y plantas afectadas, así como las diferencias entre plantas desarrolladas en un medio de cultivo adicionado con un antivitrificante y un medio de cultivo en ausencia de este.

3.5.1 Peróxido de lípidos- TBARS

La peroxidación de lípidos se determinó a través de los TBARS, según Minotti y Aust, 1987. Para ello se maceraron en frío 50 mg de material vegetal con 0.6 mL de ácido metafosfórico al 5% (p/v) y 10 µL de butil hidroxitolueno (BHT) al 2% (p/v) disuelto en etanol. El homogenizado se centrifugó a 15000 x g durante 20 min a 4°C.

Para el desarrollo del cromógeno se mezclaron 0.5 mL del sobrenadante de la centrifugación anterior con 50 µL de BHT al 2%, 250 µL de tiobarbitúrico (TBA) al 1% (p/v) disuelto en NaOH 50 mM y 250 µL de HCl al 25% (v/v) y se incubó la mezcla de reacción a 95° C durante 30 min (Minotti y Aust, 1987).

El blanco consistió en reemplazar el volumen de la muestra por medio de extracción, y los controles para cada una de las muestras fueron preparados reemplazando el TBA con NaOH 50 mM. La reacción se detuvo enfriando las muestras en hielo.

Para la cuantificación de los TBARS, el cromógeno fue extraído agregando 1.5 mL de 1-butanol. Los tubos se agitaron y se separó la fase orgánica. Se determinó la absorbancia a 532 nm y se restó la absorbancia inespecífica a 600nm. La concentración de peróxido de lípidos se expresó como la cantidad de malondialdeído formado ($E_{532} 156.10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ Rustérucci et al., 1996) y se realizaron tres repeticiones por muestra.

3.5.2 Proteínas totales

Las proteínas se determinaron por el método de Bradford (1976). A 100 µL de muestras obtenidas de los extractos enzimáticos en estudio se le agregaron 5 mL de reactivo Azul de Comassie G250 0.1 mM, etanol 0.8 M y H_3PO_4 1.5 M. La absorbancia se midió a 595 nm después de 2 min y como estándar se utilizó seroalbúmina bovina

3.5.3 Extracción de enzimas

La extracción se realizó a 4° C a partir del material biológico que había sido recogido, macerado y almacenado a -80 °C, y las actividades enzimáticas se ensayaron inmediatamente después de la extracción. Para la extracción de las enzimas SOD y CAT se utilizó el procedimiento descrito por Sainz et al., (2010). Se maceraron 0.2 g de hojas con 0.8 mL de tampón Tris-HCl 50 mM pH7.5, KCl 10 mM, 2-mercaptoetanol 14.3 mM, PMSF 1 mM, y EDTA 1 mM. El homogenado se centrifugó a 10000 x g durante 10 min.

3.5.4 Actividad SOD

La actividad de la enzima SOD se determinó según Mc. Cornd y Fridovich (1969) a través de la capacidad de reducir el citocromo c. La mezcla de reacción consistió en 1 mL de tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.8, EDTA 1.0 mM, citocromo c 1.0 mM y xantina 1.0 mM. Se agregó 0.1 U de enzima xantina oxidasa y se midió la absorbancia a 550 nm. Como blanco se usó la mezcla de reacción sin xantina oxidasa. Se definió una U como la cantidad de enzima capaz de inhibir un 50% de la reacción control y la actividad se expresó en U/mg de proteína

3.5.5 Actividad CAT

La actividad CAT se determinó según Beers y Sizer (1980) a través de la capacidad de utilizar el peróxido de hidrógeno. La mezcla de reacción consistió en 1.0 mL de tampón fosfato potásico 100 mM pH 7.0 y peróxido de hidrógeno 20 mM. Se agregaron 20 µL de extracto enzimático y se midió la variación de absorbancia a 240 nm durante 3 min. Se determinó la actividad considerando un coeficiente de extinción molar para el peróxido de hidrógeno de 39.4 mM cm⁻¹. Como blanco se usó la mezcla de reacción sin peróxido de hidrógeno. Se definió una U como la cantidad de enzima capaz de utilizar 1 µmol de peróxido de hidrógeno durante 1 min y la actividad se expresó en U/mg de proteína.

3.4. Análisis estadístico

Se usó el análisis de varianza y para ver diferencias entre medias se utilizó el Test de Tukey.

4. RESULTADOS

4.1 Portainjerto M9

4.1.1 Tasa de multiplicación

El objetivo fue buscar la combinación de sales minerales, reguladores de crecimiento y condiciones operativas de ambos tipos de biorreactores que permitieran la mayor tasa de proliferación posible. Para los portainjertos de manzano se realizaron dos ensayos para el sistema de inmersión permanente y dos para el de inmersión temporal.

4.1.1.1 Inmersión Temporal

Al trabajar con los biorreactores de inmersión temporal se plantearon dos ensayos, que se diferenciaban entre sí en la frecuencia de inmersiones, pasando de una inmersión cada tres horas a una cada ocho horas (Figura 6). A su vez, para cada frecuencia de inmersión se comparó el efecto del agregado de 40 mg/L de floroglucinol. La disminución en la frecuencia de inmersión se asoció con un descenso en la tasa de proliferación y no se observó efecto ante el agregado de floroglucinol (Figura 7).

La tasa de multiplicación obtenida con un menor número de inmersiones fue similar a la de su testigo en medio sólido. Esta disminución en la tasa de proliferación desestimó la posibilidad de plantear una nueva modificación que disminuyera aún más la frecuencia de inmersiones.

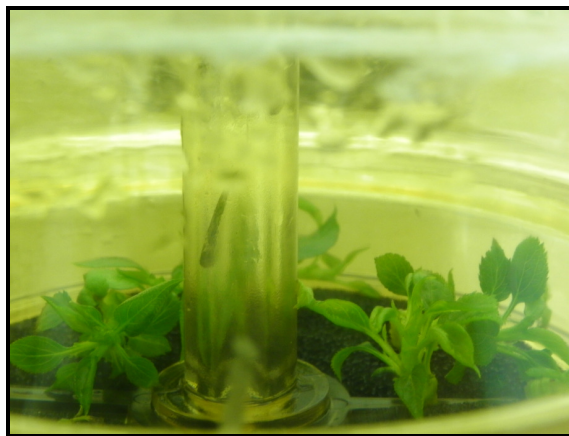


Figura 6. Plantas de M9 en biorreactores RITA[®] al inicio del ciclo del cultivo.

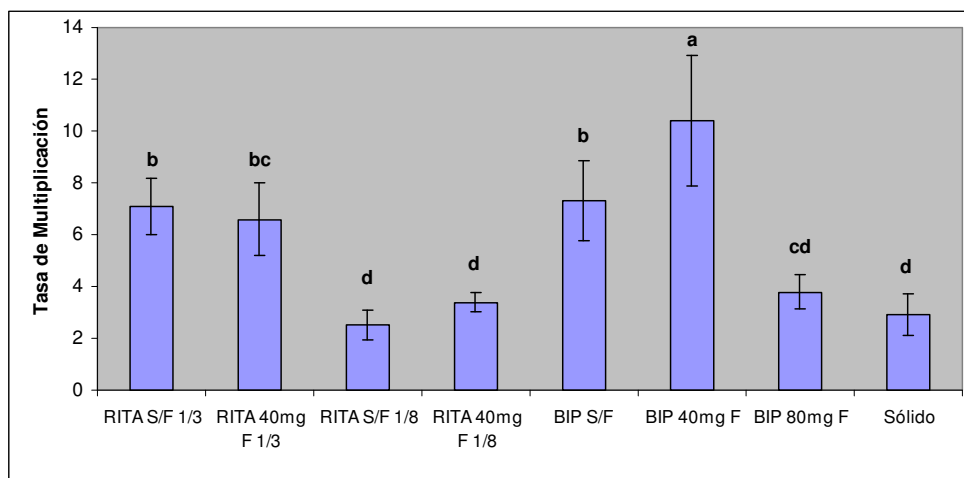


Figura 7. Tasa de multiplicación (nuevos explantos generados a partir de los cultivados inicialmente) del portainjerto M9 en medio líquido en dos sistemas de inmersión (RITA y BIP) con floriglucinol (C/F) y sin F (S/F). las frecuencias de inmersión utilizadas fueron de 1 cada 3 horas (1/3) y 1 cada 8 horas (1/8), durante 1 min. El medio sólido se usó como control. Las barras verticales representan el desvío estándar. Tratamientos seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas al 5% del Test de Tukey.

Posteriormente a probar el efecto del agregado de floriglucinol se planteó la alternativa de agregar otras moléculas al medio de cultivo, que pudieran evitar el fenómeno de la vitrificación y que permitiera una mejor performance en cuanto a la tasa de multiplicación.

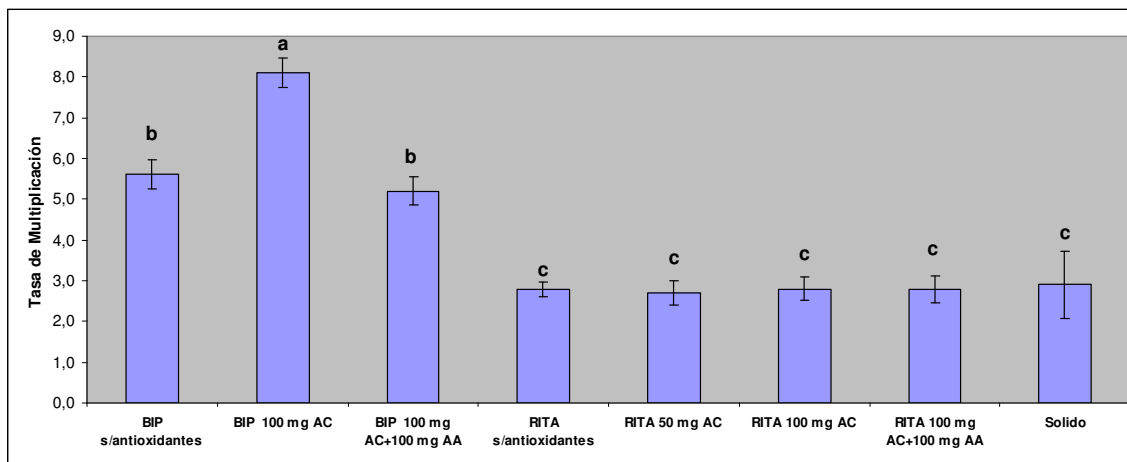


Figura 8. Tasa de multiplicación (nuevos explantos generados a partir de los cultivados inicialmente) del portainjerto M9 en medio líquido en dos sistemas de inmersión (RITA y BIP) con ácido cítrico (AC) y ácido ascórbico (AA). La frecuencia de inmersión utilizada fue de 1 cada 8 horas durante 1 min. El medio sólido se usó como control. Las barras verticales representan el desvío estándar. Tratamientos seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas al 5% del Test de Tukey

La modificación en el medio de cultivo planteada para los biorreactores de inmersión temporal, no tuvo un efecto que se viera reflejado en la tasa de proliferación de las plantas. Ni la incorporación de ácido cítrico en las dos dosis propuestas, ni el agregado

de ácido cítrico en forma conjunta con el ácido ascórbico, logró aumentar la tasa de multiplicación (Figura 8).

4.1.1.2 Inmersión Permanente

En los BIP se planteó como tratamientos, el agregado de 40 mg y 80 mg de floroglucinol por litro de medio y se utilizó en ambos casos 500 mL de medio de cultivo por biorreactor (Figura 9). Aquí se encontró que la tasa de proliferación fue mayor sin la aplicación de floroglucinol y con 40 mg/L de floroglucinol en relación al control y al tratamiento con 80 mg/L (Figura 7).

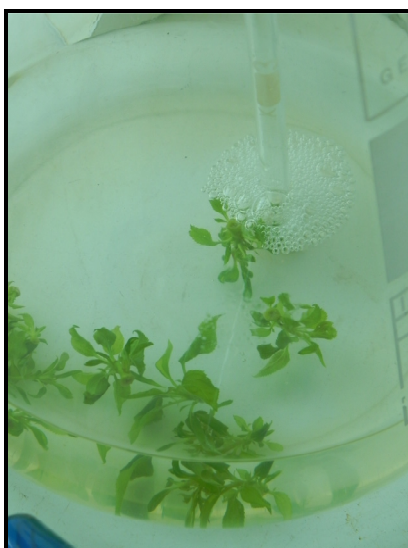


Figura 9. Plantas de M9 en biorreactores de inmersión permanente al inicio del ciclo del cultivo.

Por otra parte, al duplicar la concentración del floroglucinol, se observó un efecto de toxicidad en las plantas, provocando una necrosis y oscurecimiento de los tejidos, por lo cual se descartó el uso de esta dosis para este cultivo y para cualquier tipo de sistema de inmersión. Posteriormente se evaluó el agregado de ácido cítrico y ácido ascórbico para controlar los efectos de la hiperhidricidad, tal y como se hizo en los biorreactores de inmersión temporal.

La tasa de proliferación fue mayor en las plantas que se desarrollaron en el medio de cultivo con 100 mg/L de ácido cítrico, que cuando se utilizó ácido cítrico junto con ácido ascórbico y en todos los casos donde se cultivó en los biorreactores de inmersión permanente, la proliferación fue mayor que el control en medio sólido (Figura 8).

4.1.2 Vitricación

Al evaluar los resultados de propagar las especies seleccionadas en ambos sistemas de multiplicación de plantas, no sólo se consideró la tasa de proliferación, sino que fue de suma relevancia el nivel de vitricación que se observara en los tejidos. Dado que la vitricación es una característica no deseable para las plantas, es importante evaluarla para tener una idea del éxito de la técnica. Esta evaluación se llevó a cabo mediante la observación y registro del porcentaje de la planta afectada por este desorden fisiológico.

4.1.2.1 Inmersión temporal:

En el cuadro 6 pueden observarse los niveles de hiperhidricidad alcanzados en los ensayos planteados para los portainjertos de manzano y su comparación con los promedios que se vieron en el testigo cultivado en medio sólido. Las plantas de los cuatro tratamientos mostraban síntomas de hiperhidricidad severos, con tejidos suculentos y deformes (Figura 10).

Cuadro 6. Porcentaje de vitricación en los RITA con diferente frecuencia de inmersión con y sin agregado de floroglucinol.

<i>Tratamiento</i>	<i>Porcentaje de vitricación</i>
1min/3h sin floroglucinol	100
1min/3h 40mg floroglucinol	100
1min/8 h sin floroglucinol	90
1min/8h 40mg floroglucinol	90
Sólido	0



Figura 10. Planta de M9 con severos síntomas de vitricación al final del ciclo de crecimiento en RITA.

La vitricación es resultado de la situación de estrés a la que se somete al cultivo cuando se lo hace crecer en medio líquido, por eso se disminuyó la frecuencia de inmersiones con el fin de minimizar estas condiciones de estrés. Al evaluar este parámetro

luego de bajar la frecuencia de inmersiones de 1 cada 3 horas a 1 cada 8 horas, se ve que afectó poco el porcentaje de vitrificación pero disminuyó la tasa de multiplicación, lo que permite sugerir que mayores tiempos entre inmersiones reduciría aun más la tasa de multiplicación.

En la búsqueda de ajustar la técnica que permita propagar los portainjertos de manzano en medio líquido con menores costos y mejores rendimientos, se agregó ácido cítrico y ácido ascórbico al medio de cultivo (Cuadro 7).

Cuadro 7. Porcentaje de vitrificación en los RITA con diferente frecuencia de inmersión con ácido cítrico y ácido ascórbico.

<i>Tratamiento</i>	<i>Porcentaje de vitrificación</i>
1min/8 h	100
1min/8 h 50 mg/L ác. cítrico	50
1min/8 h 100 mg/L de ác. cítrico	30
1min/8 h 100 mg/L ác. cítrico+100 mg/L ác. ascórbico	30
Sólido	0

Estos resultados muestran que existe una respuesta positiva en la disminución de la vitrificación frente al agregado de ácido cítrico, ya que se lograron bajar al 50 % las plantas afectadas agregando 50 mg/L de medio y duplicando esta dosis se llegó a un 30% de vitrificación (Figura 11).



Figura 11. Plantas control sin ácido cítrico (arriba) y con 100 mg de ácido cítrico (abajo).

Por otro lado, al incorporar 100 mg/L ácido ascórbico no se obtuvieron diferencias con el tratamiento que tenía 100 mg/L de ácido cítrico. Es de destacar que ninguno de los tratamientos evitó la vitrificación.

4.1.2.2 Inmersión permanente

A continuación se presentan los resultados obtenidos a partir de la multiplicación de los portainjertos M9 en estos biorreactores en contraposición con las mismas variables medidas en el testigo de medio sólido (Cuadro 8).

Cuadro 8. Porcentaje de vitrificación en inmersión permanente.

<i>Tratamiento</i>	<i>Porcentaje de vitrificación</i>
Sin floroglucinol	100
40 mg/L de floroglucinol	100
80 mg/L de floroglucinol	100
Sólido	0

El tratamiento correspondiente al cultivo de plantas sin agregado de floroglucinol tuvo como resultado una tasa de multiplicación de 7.3 (Figura 7), la cual supera a la resultante del testigo en medio sólido, pero con un porcentaje de vitrificación del 100 %. El grado de vitrificación que mostraron las plantas propagadas en medio líquido por el sistema de inmersión permanente generó órganos deformes, succulentos y frágiles.

Intentando mejorar la performance del portainjerto M9 en biorreactores de inmersión permanente y siguiendo con el protocolo utilizado en los RITA[®], se propuso agregar ácido cítrico y ácido ascórbico en el medio de cultivo (Cuadro 9).

Cuadro 9. Porcentaje de vitrificación en inmersión permanente

<i>Tratamiento</i>	<i>Porcentaje de vitrificación</i>
Control	100
100 mg de ác. cítrico	100
100mg ác. cítrico+100 ác. ascórbico	100
Sólido	0

Estos resultados permiten ver que el uso de estas moléculas no tuvo efecto en disminuir el porcentaje de vitrificación de las plantas, ni actuando solamente el ácido cítrico, ni con el agregado de ácido ascórbico. Cabe destacar que se constató que las plantas tratadas con ácido cítrico o con ácido cítrico + ácido ascórbico, alcanzaban un menor grado de rigidez de los tejidos, lo cual las hacían menos quebradizas y a su vez tenían una coloración mas verde, sin embargo todas las plantas presentaban síntomas de hiperhidricidad.

4.1.3 Daño celular en tejidos de plantas de M9

El material vegetal se clasificó en cuatro grupos, en base al grado de afección y a la procedencia del mismo. Por un lado, tejido correspondiente a plantas vitrificadas provenientes del cultivo en los RITA[®]. En un segundo grupo, tejidos no vitrificados provenientes de medio del cultivo sin floroglucinol. En un tercer grupo, material sin indicios de vitrificación pero provenientes del cultivo en medio líquido con floroglucinol, y en un último grupo, tejidos de plantas correspondientes al testigo crecido en medio sólido que no presentaba signos de vitrificación y se analizó el daño oxidativo a través de TBARS (Figura 12).

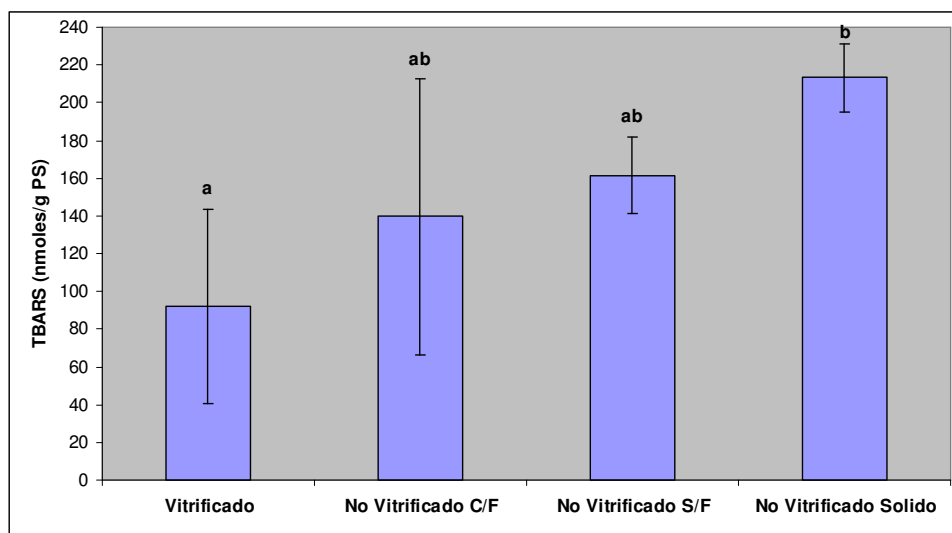


Figura 12. TBARS en tejidos vitrificados y no vitrificados del portainjerto M9 en RITA[®] con (C/F) o sin (S/F) el agregado de floroglucinol. Las barras verticales representan el desvío estándar. Tratamientos seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas al 5% del Test de Tukey

Se observó un mayor y significativo nivel de TBARS en los tejidos no vitrificados que en los que si presentaban signos de vitrificación. A su vez las plantas que correspondían al cultivo en medio líquido con o sin floroglucinol no presentaron diferencias significativas entre sí, ni con el tratamiento vitrificado. (Figura 13).

Este análisis se realizó únicamente con las plantas crecidas en el sistema de inmersión temporal, ya que las que crecieran en los biorreactores permanentes, no presentaron tejidos sanos, sin vitrificación que permitieran realizar una comparación en este parámetro.

Al realizarse posteriormente los tratamientos con ácido cítrico y ácido ascórbico para disminuir los efectos de la vitrificación (Cuadro 7), se decidió efectuar la

determinación de TBARS correspondientes a estos, para evidenciar el efecto de los mencionados antivitrificantes en este parámetro evaluado (Figura 13).

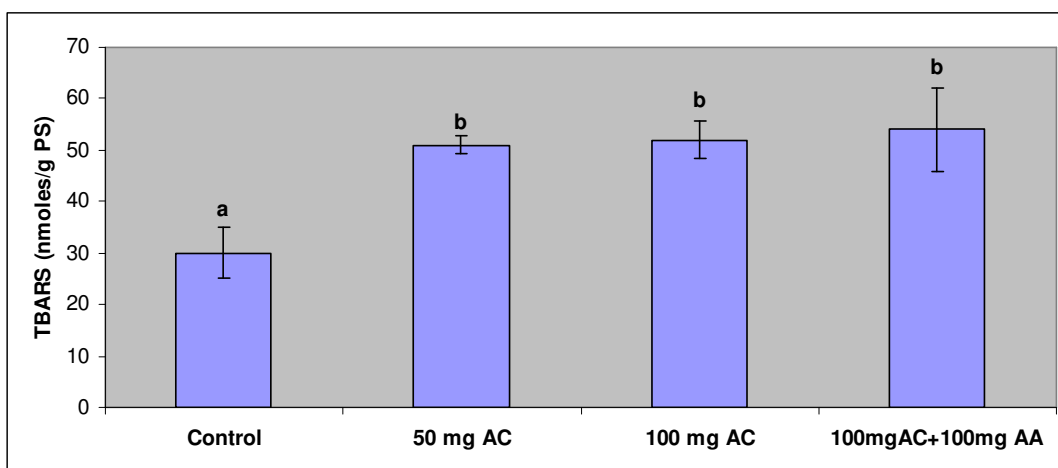


Figura 13. TBARS en tejidos de plantas de M9 crecidas en RITA® con ácido cítrico (AC) y ácido ascórbico (AA). Las barras verticales representan el desvío estándar. Tratamientos seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas al 5% del Test de Tukey.

La figura 13 muestra los niveles de TBARS que presentan los tres tratamientos propuestos, con 50 mg y 100 mg de ácido cítrico por litro de medio, y 100 mg de ácido cítrico más 100 mg de ácido ascórbico, en comparación con el control de plantas crecidas en un medio de cultivo sin agregado de estos compuestos.

Lo que se observa, es que el agregado de ácido cítrico y ácido ascórbico aumentó los niveles de TBARS de los tejidos en comparación con su control sin estas moléculas.

El otro resultado observado fue que no se obtuvieron diferencias significativas en la concentración de TBARS entre los tratamientos correspondientes a los 50 mg de ácido cítrico, 100 mg de ácido cítrico y 100 mg de ácido cítrico más 100 mg de ácido ascórbico.

4.1.4 Actividad SOD

Los resultados obtenidos en las concentraciones de los TBARS, no permitían explicar el aumento de la vitrificación observado en el tratamiento que contaba con mayores inmersiones por día, por eso se propuso realizar la medición de la actividad de la SOD dado que es la enzima encargada de eliminar las formas reductoras del oxígeno mediante la generación de peróxido de hidrógeno.

Para la medición de la actividad de esta enzima se utilizaron los materiales vegetales conservados a -80° C y se clasificaron en los mismos cuatro grupos que se utilizaron para la determinación de los TBARS, plantas vitrificadas, no vitrificadas

crecidas en medio de cultivo con floroglucinol, no vitrificadas crecidas en medio de cultivo sin floroglucinol y plantas no vitrificadas cultivadas en el testigo de medio sólido (Figura 14).

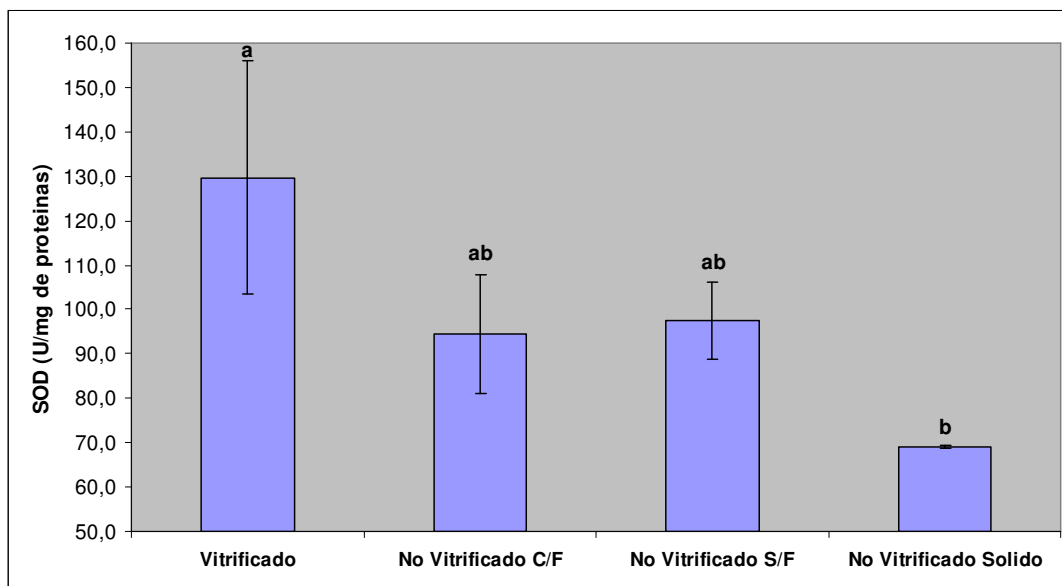


Figura 14. Actividad SOD en tejidos vitrificados y no vitrificados de M9 en RITA® y control en medio sólido. Las barras verticales representan el desvío estándar. Tratamientos seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas al 5% del Test de Tukey

El material vegetal vitrificado fue el que presentó mayor actividad SOD con respecto al material menos vitrificado tratados con y sin floroglucinol y el testigo en medio sólido no vitrificado (Figura 14).

No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con y sin floroglucinol, lo cual implica que no hay efecto del precursor de síntesis de lignina utilizado sobre la actividad de la SOD.

Posteriormente se midió la actividad SOD para los tratamientos con el agregado de ácido cítrico y ácido ascórbico y se comparó con un control sin agregado de estas moléculas (Figura 15).

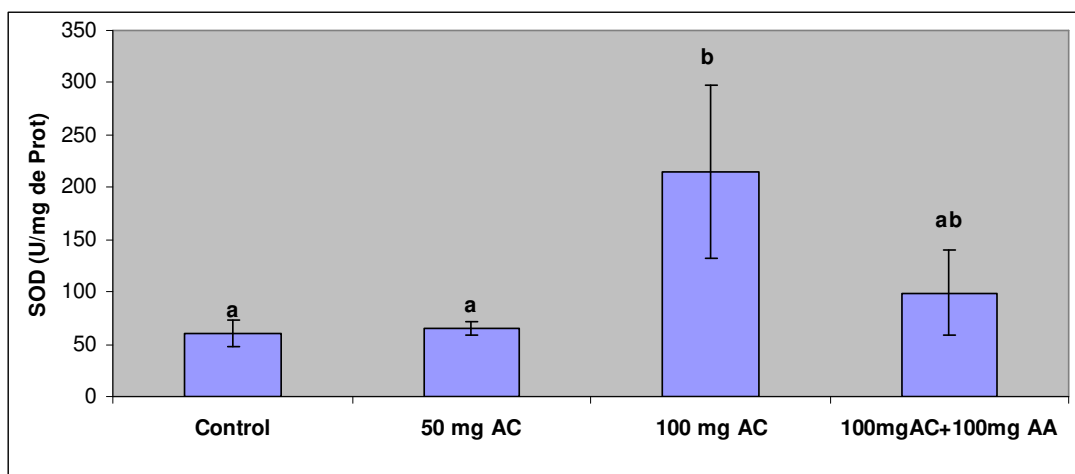


Figura 15. Actividad SOD en tejidos de plantas de M9 crecidas en RITA[®] con ácido cítrico (AC), ácido ascórbico (AA) y control en medio sólido. Las barras verticales representan el desvío estándar. Tratamientos seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas al 5% del Test de Tukey

La actividad SOD no presentó diferencias significativas cuando se compararon los resultados observados en las plantas crecidas en un medio de cultivo en el que se incorporó 50 mg/L de ácido cítrico y las plantas control. Cuando la dosis de ácido cítrico se duplicó, la actividad SOD aumentó significativamente respecto al control como con el medio que contenía 50 mg/L.

Al agregar ácido ascórbico al medio de cultivo en forma conjunta con el ácido cítrico, no aumentó la actividad de la SOD, sino que bajó su actividad en comparación con el tratamiento en el que solo se agregó ácido cítrico en una dosis de 100 mg/L y se obtuvieron valores intermedios entre este y el del control y el del tratamiento con 50 mg/L.

4.1.5 Actividad CAT

Los portainjertos M9 crecidos en los biorreactores de inmersión temporal y en medios de cultivo adicionados con ácido cítrico y ácido ascórbico, se realizó la medición de la actividad de otra enzima que interviene en la destoxificación de las ROS, la enzima CAT.

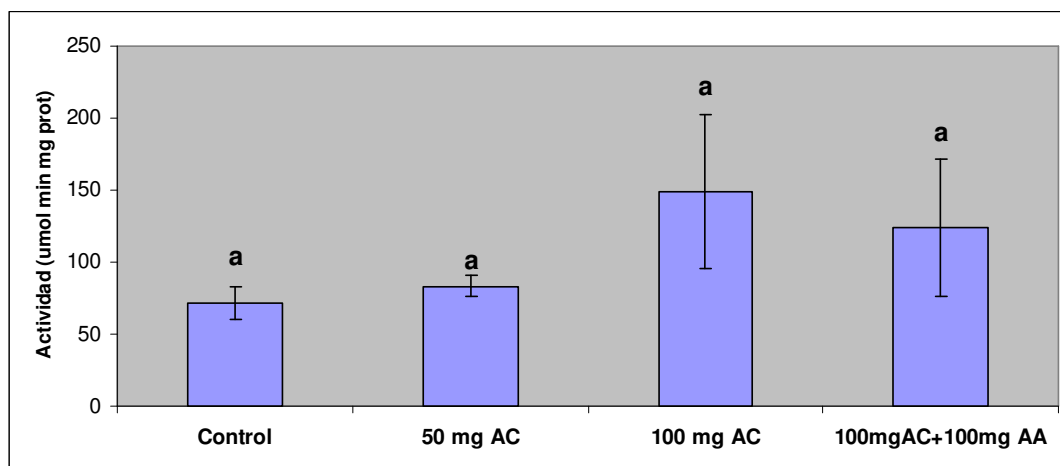


Figura 16. Actividad CAT en tejidos de plantas de M9 crecidas en RITA[®] con ácido cítrico (AC), ácido ascórbico (AA) y control en medio sólido. Las barras verticales representan el desvío estándar. Tratamientos seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas al 5% del Test de Tukey

Los resultados del análisis de la actividad CAT, mostraron que no hubieron diferencias significativas entre los tratamientos a diferentes dosis de ácido cítrico, ácido ascórbico y el control sin agregado de estas moléculas (Figura 16).

4.2 Eucalipto

Para el eucalipto se planteó la evaluación de los mismos parámetros que en el caso de los portainjertos de manzano, con el fin de evaluar el comportamiento y el desarrollo de las plantas crecidas en ambos tipos de biorreactores y bajo las diferentes condiciones de los tratamientos propuestos.

4.2.1 Tasa de multiplicación

En los eucaliptos se realizó un ensayo para el sistema de inmersión permanente y otro para el de inmersión temporal. El objetivo fue buscar la combinación de sales minerales, reguladores de crecimiento y condiciones operativas de ambos tipos de biorreactores que permitieran la mayor tasa de proliferación posible.

4.2.1.1 Inmersión temporal

Los tratamientos correspondientes a las plantas de eucalipto crecidas en los biorreactores tipo RITA[®] tuvieron una frecuencia de inmersión de 1 minuto cada 8 horas. La diferencia entre ambos tratamientos es que uno tenía 40 mg/L de floroglucinol, mientras que su control carecía de este antivitrificante. Ambos tratamientos fueron comparados con el testigo en medio sólido.

En las plantas de eucalipto crecidas en los biorreactores tipo RITA[®], la tasa de multiplicación fue mayor, con y sin floroglucinol, respecto al control en medio sólido. No se observaron diferencias significativas en los niveles de proliferación con y sin el agregado de floroglucinol (Figura 17).

4.2.1.2 Inmersión permanente

En la evaluación de la tasa de multiplicación para los tratamientos que corresponden a la propagación en biorreactores de inmersión permanente con y sin floroglucinol (Figura 17), se observó que la tasa de proliferación es significativamente superior a la obtenida tanto en el control en medio sólido como en los tratamientos correspondientes al sistema de propagación en los biorreactores tipo RITA[®].

En este caso, al igual que en el sistema de inmersión temporal, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento que incluía floroglucinol y el que no.

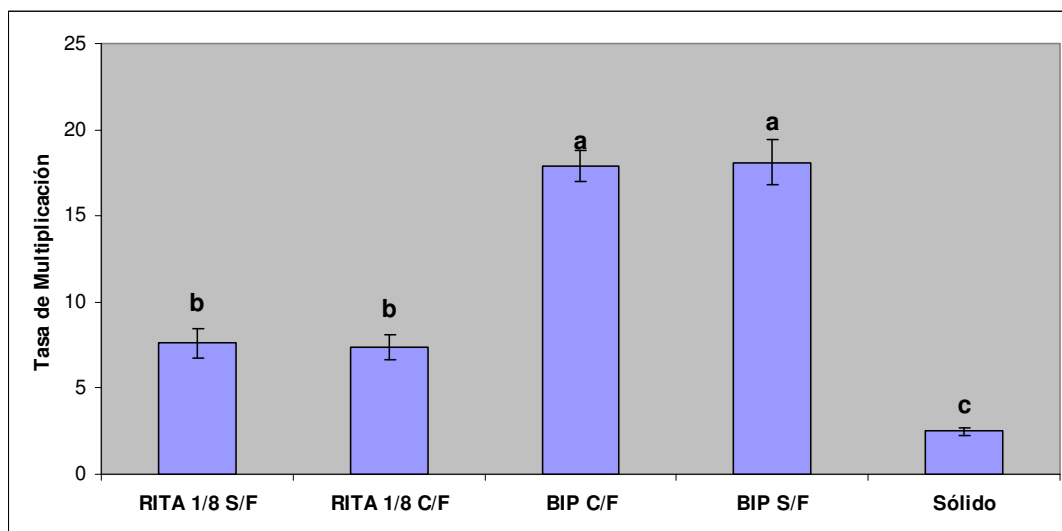


Figura 17. Tasa de multiplicación (nuevos explantos generados a partir de los cultivados inicialmente) del eucalipto en medio líquido en dos sistemas de inmersión (RITA y BIP) con floroglucinol (C/F) y sin F (S/F). La frecuencia de inmersión utilizada fue de 1 cada 8 horas (1/8) durante 1 min. El medio sólido se usó como control. Las barras verticales representan el desvío estándar. Tratamientos seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas al 5% del Test de Tukey

4.2.2 Repique de las plantas al medio sólido

A continuación se presentan los resultados obtenidos de la medición de la altura máxima, el peso fresco y la tasa de multiplicación de las plantas crecidas en medio sólido, y plantas que crecieron en BIP con y sin floroglucinol y luego pasaron a crecer en medio sólido.

Las plantas a partir de las cuales se hizo este análisis, crecieron todas en medio sólido, con la diferencia de que las del testigo nunca pasaron por una fase de multiplicación en medio líquido, mientras que las otras dos se desarrollaron en los BIP.

4.2.2.1 Altura máxima de las plantas:

En la figura 18 se muestra el desarrollo en altura de las plantas y pueden compararse los niveles de elongación de las mismas creciendo en medio sólido exclusivamente y creciendo en medio sólido luego de haber pasado por una fase de crecimiento en los biorreactores de inmersión permanente con y sin uso de floroglucinol.

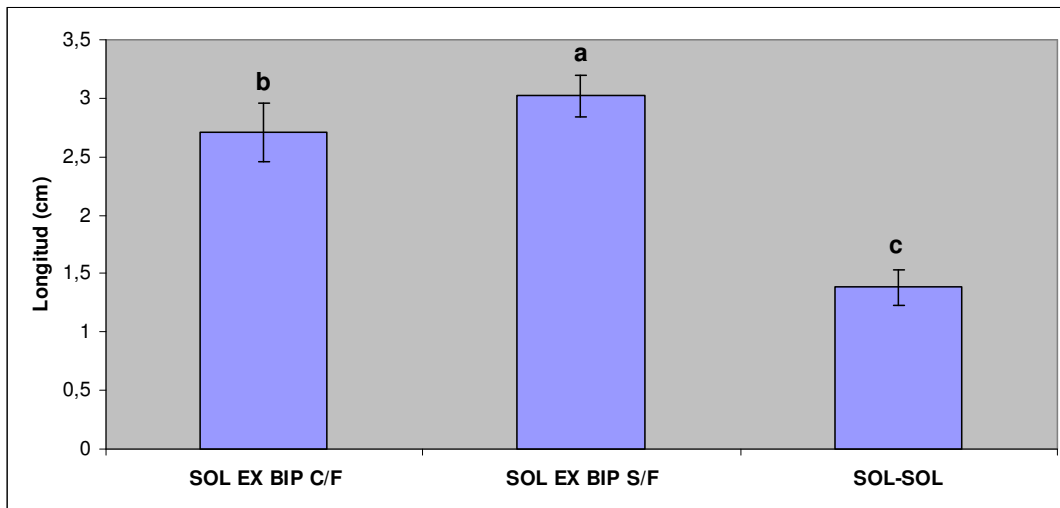


Figura 18. Longitud (cm) de plantas de eucalipto multiplicadas en medio líquido con (SOL EX BIP C/F) y sin (SOL EX BIP S/F) floroglucinol y transferidas a medio sólido. Control en medio sólido (SOL-SOL). Las barras verticales representan el desvío estándar. Tratamientos seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas al 5% del Test de Tukey

Las plantas crecidas en medio líquido con el uso de los biorreactores de inmersión permanente, presentaron mayor longitud con significativa diferencia en comparación con las que nunca pasaron por este tipo de sistema de propagación, llegando en promedio, al doble de largo que estas últimas (Figura 18).

En La figura 19 se observan plantas cultivadas en BIP y luego transferidas a medio sólido y plantas cultivadas exclusivamente en medio sólido.

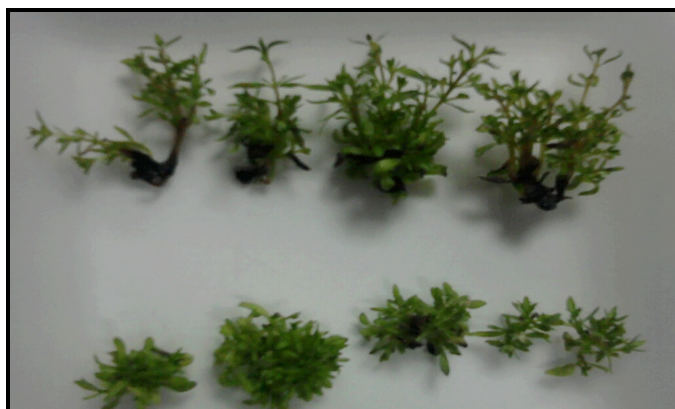


Figura 19. Plantas provenientes del medio sólido después de haber pasado por BIP (arriba) y plantas de testigo en medio sólido (abajo).

4.2.2.2 Peso fresco de las plantas

En cuanto al peso fresco de las plantas las que fueron cultivadas en los BIP presentaron el doble de peso que las que estaban cultivadas en medio sólido (Figura 20).

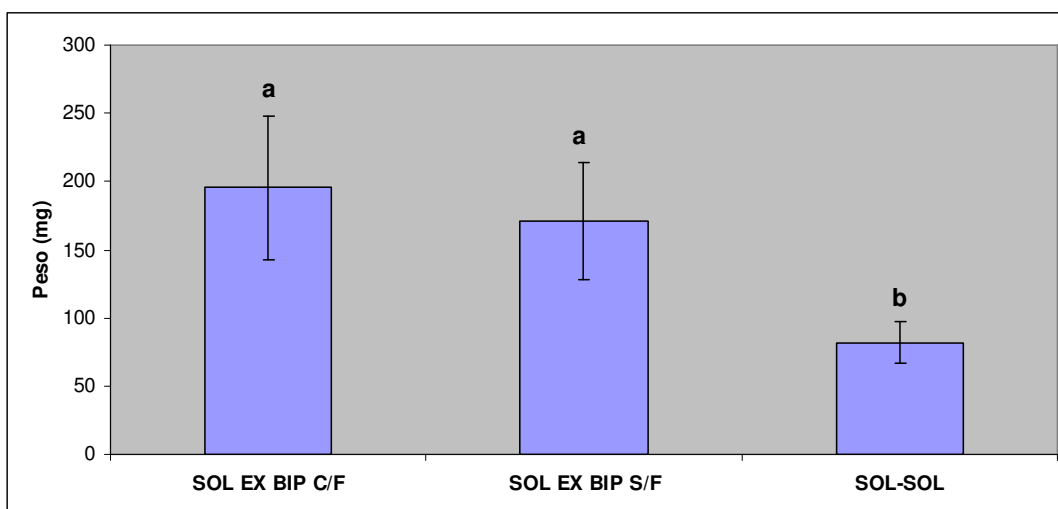


Figura 20. Peso fresco (mg) de plantas de eucalipto multiplicadas en medio líquido con (SOL EX BIP C/F) y sin (SOL EX BIP S/F) floroglucinol y transferidas a medio sólido. Control en medio sólido (SOL-SOL). Las barras verticales representan el desvío estándar. Tratamientos seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas al 5% del Test de Tukey

Debido al mayor desarrollo en altura y un mayor engrosamiento de la planta, el cual se constatará visualmente al momento de la evaluación del crecimiento de las mismas, también se constató un mayor peso de las plantas que pasaron por medio líquido en comparación con las desarrolladas únicamente en medio sólido, además no existen diferencias significativas entre los tratamientos con y sin floroglucinol.

4.2.2.3 Tasa de proliferación

Los parámetros antes estudiados son los que explican que a la hora de evaluar la tasa de proliferación de las plantas crecidas en medio sólido exclusivamente y compararlas con aquellas que tuvieran un pasaje por un cultivo en medio líquido, se observó que las segundas presentó un mayor valor en este aspecto del crecimiento (Figura 21).

Tampoco se observaron diferencias significativas en la tasa de proliferación de plantas crecidas en medio de cultivo con floroglucinol y sin él, una vez que se vuelven a cultivar en medio sólido.

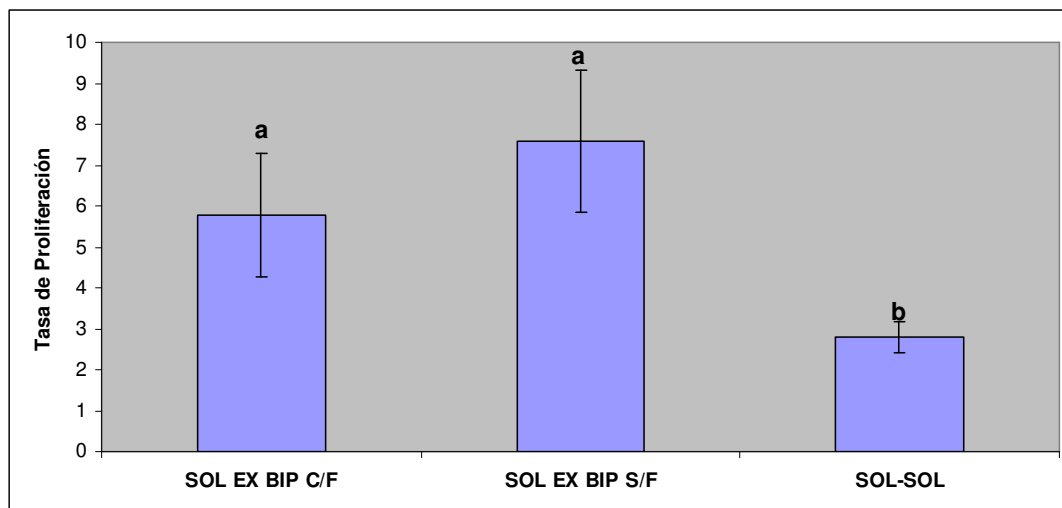


Figura 21. Tasa de proliferación de plantas de eucalipto multiplicadas en medio líquido con (SOL EX BIP C/F) y sin (SOL EX BIP S/F) floroglucinol y transferidas a medio sólido. Control en medio sólido (SOL-SOL). Las barras verticales representan el desvío estándar. Tratamientos seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas al 5% del Test de Tukey

4.2.3 Porcentaje de vitrificación

Al igual que lo ocurrido con el portainjerto M9, el grado de vitrificación de los propágulos fue un parámetro de importancia a la hora de evaluar el desarrollo de los mismas, ya que este es quien determina en gran medida la posibilidad de sobrevivencia de las plantas tanto al ser repicadas nuevamente como al ser trasplantadas para su aclimatación. Debido a esto se estimó este parámetro tanto para las plantas desarrolladas en BIP como en los RITA®.

4.2.3.1 Inmersión temporal

Los porcentajes de vitrificación que se muestran en el cuadro 10 corresponden a los tratamientos en los biorreactores tipo RITA[®] sin floroglucinol y con floroglucinol, y el control en medio sólido.

Cuadro 10. Porcentaje de vitrificación en inmersión temporal con y sin floroglucinol vs. control en medio sólido.

<i>Tratamiento</i>	<i>% de Vitrificación</i>
1min/8 h sin floroglucinol	10
1min/8h 40mg/L de floroglucinol	10
Sólido	0

Con respecto al grado de vitrificación de las plantas, el resultado observado fue de un 10% en las plantas correspondientes a los tratamientos en medio líquido, sin diferencias significativas entre ellos. Las plantas desarrolladas en el medio sólido no presentaron indicios de vitrificación.

A pesar de no observarse diferencias significativas en los anteriores parámetros de rendimiento y calidad de planta entre los dos tratamientos analizados, si se pudo apreciar una diferencia cualitativa en lo que respecta al desarrollo de la planta, notándose una morfología más arrosada y entrenudos mas cortos de las crecidas en el medio de cultivo que contenía floroglucinol, con respecto a las que no lo tenían, asociado a una mayor resistencia a quebrarse, determinando que sean plantas mas resistentes a la manipulación de las mismas.

El 10% de vitrificación no corresponde a que el 10 % de las plantas estuvieran totalmente vitrificadas, sino que algunas plantas presentaban alguna hoja o partes de la planta con síntomas, generalmente en la parte basal de las mismas, donde se encuentran los tejidos más viejos y por ende, mas estresados (Figuras 22 y 23).

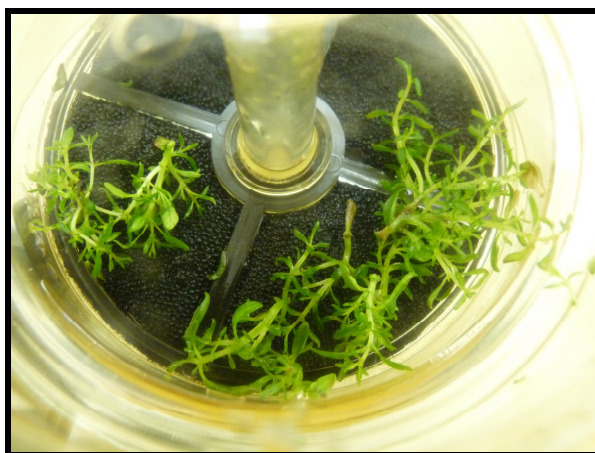


Figura 22 Propagación de plantas de eucaliptos en RITA[®] al final del ciclo de crecimiento.



Figura 23: Morfología de plantas de eucaliptos en RITA[®] al final del ciclo de crecimiento.

4.2.3.2 Inmersión permanente

En este sistema de propagación se observaron los mismos porcentajes de vitrificación que en el sistema tipo RITA[®], alcanzando a niveles del 10 % para ambos tratamientos, con y sin floroglucinol, en contraposición al 0% observado en las plantas crecidas en medio sólido.

Cuadro 11. Porcentaje de vitrificación en inmersión permanente con y sin floroglucinol vs. control en medio sólido.

<i>Tratamiento</i>	<i>% de vitrificación</i>
Sin floroglucinol	10
40 mg/L de floroglucinol	10
Sólido	0

La aclaración hecha para el caso de los biorreactores de inmersión temporal para este parámetro evaluado, son también aplicables a este caso, es decir, que el porcentaje de vitrificación observado en las plantas, corresponde a hojas o estructuras de la parte mas vieja de la planta y puede verse claramente la diferencia en la proliferación de una planta y otra (Figura 24).

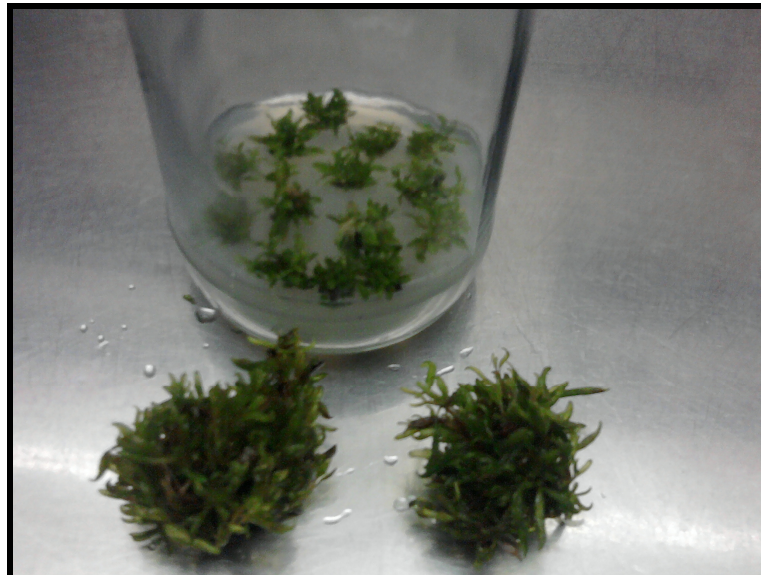


Figura 24. Desarrollo de plantas de eucalipto crecidas en BIP (abajo) y en medio sólido (arriba).

4.2.4 Actividad SOD

En el caso del eucalipto, la medición de la actividad SOD se realizó, por un lado, para las plantas que siempre fueron repicadas en medio sólido y que se usaron como testigos y por otro lado en los siguientes tratamientos: plantas crecidas en los BIP con y sin floroglucinol, seguidamente plantas crecidas en los RITA con y sin floroglucinol y plantas crecidas en los BIP con y sin floroglucinol y luego fueron repicadas a medio sólido. En la figura 25 se muestra la comparación de la actividad de la SOD en los tratamientos antes descritos.

No se encontraron diferencias significativas en la actividad SOD medida en los tratamientos de plantas crecidas en los BIP con y sin floroglucinol, los propagados en los RITA[®] en ausencia y en presencia del precursor de lignina, las plantas que luego de haber crecido en los BIP sin floroglucinol pasaron a crecer en medio sólido y las del control en medio sólido.

Las plantas que mostraron una mayor actividad SOD fueron las que luego de haberse desarrollado en un medio líquido con floroglucinol en BIP, pasaron a crecer en un medio sólido.

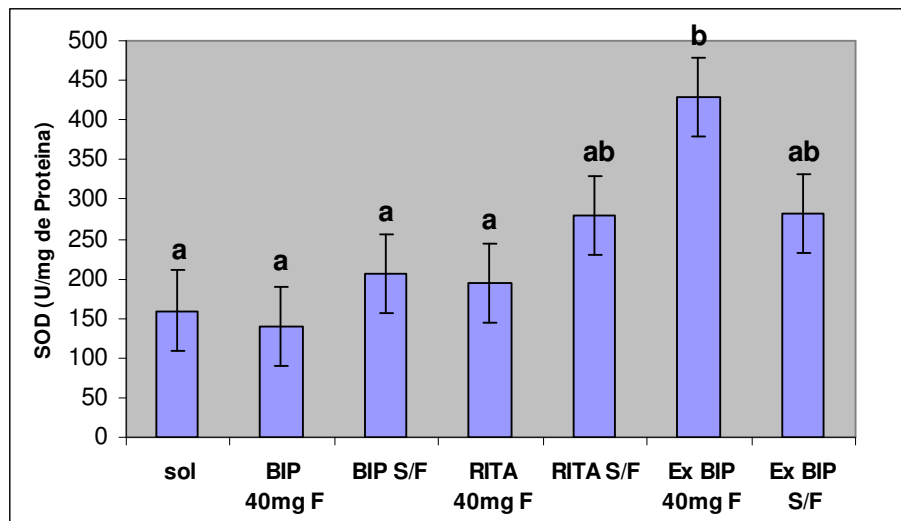


Figura 25: Actividad SOD para los tratamientos de plantas crecidas en los BIP con floroglucinol (BIP 40 mg F) y sin floroglucinol (BIP S/F), plantas crecidas en los RITA con floroglucinol (RITA 40 mg F) y sin floroglucinol (RITA S/F), plantas que crecieron en los BIP con (Ex BIP 40 mg F) y sin (Ex BIP S/F) floroglucinol y luego fueron repicadas a medio sólido y su control en medio sólido (sol). Las barras verticales representan el desvío estándar. Tratamientos seguidos de la misma letra no presentan diferencias significativas al 5% del Test de Tukey

5. DISCUSION

5.1 Tasa de proliferación de las especies leñosas evaluadas

En el análisis de la tasa de multiplicación de las plantas que se trabajaron en esta tesis, se observó que el uso de medios líquidos con biorreactores, aumenta significativamente la tasa de proliferación con respecto a la propagación en medio sólido. Este primer resultado obtenido, coincide con diversos trabajos en los cuales se observaron aumentos significativos en las tasas de multiplicación de diferentes especies vegetales (Alvard et al., 1993; Teisson y Alvard 1995; Etienne et al., 1997). Más puntualmente, Chakrabarty et al. (2003, 2006), estudiaron el efecto del cultivo *in vitro* en medio líquido del portainjerto M9 en comparación con el comportamiento en medio sólido y llegaron a los mismos resultados que los que se obtuvieron en este trabajo, de una mayor tasa de proliferación de las plantas crecidas en medio líquido en comparación con las crecidas en medio sólido.

Por otro lado, para el caso de la propagación de plantas de eucalipto, los resultados de una mayor tasa de multiplicación de los explantos crecidos en medio líquido en relación a los crecidas en medio sólido, coinciden con los observado por Palhares et al. (2004), así como en trabajos realizados dentro del programa de biotecnología de Mondi Forests, en Sudáfrica (Mc. Alister et al., 2005).

El aumento que se observa en la tasa de proliferación de las plantas cultivadas en medio líquido con respecto a la observada en condiciones de medio sólido, se explica por una serie de condiciones que se dan en este tipo de cultivo y por el uso de los biorreactores y el ambiente que estos le proporcionan a las plantas para su desarrollo.

Estas condiciones son:

- Al estar la totalidad de la planta en contacto directo con el medio de cultivo, existe una mayor superficie de ingreso de los nutrientes al interior de los tejidos vegetales.
- La naturaleza líquida del medio de cultivo, hace que sea más rápida y eficiente la difusión de dichos nutrientes a la célula cuando el medio de cultivo es líquido (Archambault et al., 1994).
- El continuo burbujeo del medio de cultivo en los BIP y la agitación que se genera en los RITA[®], hace que las plantas disminuyan la expresión de la dominancia apical al discontinuar la verticalidad de las mismas en el

periodo de crecimiento. Esta situación genera la inducción y proliferación de numerosas yemas axilares, lo cual se traduce directamente en un incremento en el desarrollo de las plantas y en un aumento del número de brotes que estas tienen (Mehrotra et al. 2007).

El ingreso de aire filtrado a los BIP y las instancias en las que las plantas no están en contacto con el medio de cultivo en los RITA[®], son los eventos que permiten la aireación del medio de cultivo, la oxigenación que los tejidos vegetales requieren para su sobrevivencia y la ventilación de compuestos tales como CO₂ y etileno (Merchuk, 1990; Cazzulino et al., 1991; Takayama y Akita, 1998).

Cada sistema de propagación evaluado en este trabajo tiene, por sus características, un modo diferente de regular y controlar la aireación del cultivo y esto es una de las principales estrategias para asegurar el éxito o fracaso del cultivo. En el caso del sistema RITA[®], las frecuencias de las inmersiones son la principal herramienta para controlar las condiciones del cultivo desde el punto de vista de la oxigenación de los explantos. Esta regulación tiene un efecto directo sobre la propagación de las plantas, y si bien fue necesario bajar la frecuencia de las inmersiones de 1 minuto cada 3 horas a 1 minuto cada 8 horas para disminuir los efectos de la vitrificación y así mejorar la calidad de las plantas, esto tuvo como efecto secundario una disminución en la tasa de multiplicación de las mismas, lo cual se asocia a un menor tiempo de contacto entre las plantas y los nutrientes y reguladores de crecimiento del medio de cultivo. Este resultado se observó principalmente en las plantas del portainjerto M9, las cuales llegaron a una tasa de proliferación de 3.4 y 2.5, con y sin floroglucinol respectivamente, cuando se bajó a una inmersión de 1 minuto cada 8 horas. Esta tasa de multiplicación fue similar a la experimentada en la propagación en medio sólido, la que promedia en 2.9. Las diferencias entre estas medias no fueron estadísticamente significativas. Lo observado es respaldado por diferentes autores que destacan las ventajas asociadas al cultivo en medios líquidos en biorreactores (Cazzulino et al., 1991; Archambault et al., 1994; Heyerdahl et al., 1995; Leathers et al., 1995).

Trabajos realizados en manzano por el Department of Crop Science, Swedish University of Agricultural Sciences en el 2006, mostraron una mayor tasa de multiplicación de los explantos al tener una frecuencia de inmersión de 16 veces por día en comparación con 8 veces por día.

Otro resultado que respalda esta relación entre la duración de las inmersiones y el nivel de proliferación de las plantas es la significativa superioridad que se observó en las plantas de ambas especies propagadas en los BIP en relación a las que crecieron en el

sistema de inmersión parcial. Este efecto de mayor propagación fue más evidente en el cultivo de las plantas de eucalipto, lo que indicaría que se trata de una especie menos sensible a las condiciones de hipoxia que las plantas de manzano. Esto hizo que los resultados en cuanto al nivel de proliferación fueran mas satisfactorios en el cultivo del eucalipto que en de las plantas del portainjerto M9.

En el caso del M9, la mejor situación en cuanto a la tasa de proliferación fue en el caso del cultivo de esta especie en los BIP con 40 mg de floroglucinol por litro de medio, en donde se llegó a un valor promedio de 10.4, mientras que el mejor resultado en los biorreactores de inmersión temporal alcanzó un valor de 3.4.

En el caso del cultivo de eucalipto, la tasa de proliferación en los RITA[®] fue de 7.6 y en el cultivo en los BIP alcanzó un promedio de 18.1, en ambos casos, un resultado superior al promedio de 2.5 del cultivo en medio sólido. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Palhares et al. (2004), quienes muestran resultados de mejor desarrollo y calidad de plantas de *E. urograndis* crecidas en biorreactores en comparación con las crecidas en medio sólido.

5.2 Repique de las plantas al medio sólido

Luego del pasaje de las plantas de eucalipto por el medio líquido, se propuso repicar estas plantas a condiciones de cultivo en medio sólido para evaluar el comportamiento de estas desde el punto de vista de su desarrollo y compararlo con el desarrollo de plantas que habían sido propagadas únicamente en medio sólido. Los resultados observados fueron muy positivos, ya que frente a una situación idéntica de cultivo, las plantas que habían pasado por el medio líquido mostraron un crecimiento significativamente superior que las plantas que crecieron en el medio sólido. Este hecho fue constatado mediante la medición de la longitud de la planta, que pasó de 1.4 cm en plantas crecidas únicamente en medio sólido a 3 cm cuando pasaron por medio líquido. Al evaluar el peso fresco de las plantas crecidas en una y otra situación, el valor aumentó de 81.7 mg a 195.5 mg y la consecuente tasa de propagación pasó de 2.8 a 5.8 respectivamente.

La mayor disponibilidad y facilidad de absorción de nutrientes y reguladores de crecimiento que se experimenta en las condiciones de cultivo en medio líquido, hacen que la planta mantenga un crecimiento más activo durante su desarrollo en el medio sólido, con

un estímulo hormonal y nutricional que le permite mantener tasas de crecimiento altas, aunque las nuevas condiciones de cultivo no sean tan propicias (Archambault et al., 1994).

Este análisis permite, no solo constatar el efecto que tiene sobre las plantas el pasaje por un sistema de cultivo en biorreactores, sino que permite además crear un protocolo de propagación en donde el cultivo en medio líquido no sea exclusivo, sino que este sea parte de un programa de multiplicación en medio sólido. De esta manera se pueden hacer rápidos aumentos en el número de plantas mediante el uso de biorreactores y luego seguir multiplicándolas en medio sólido, con menores riesgos de contaminación y de aparición de vitrificación, pero con mayores tasas de proliferación debido al efecto residual que las plantas mantienen.

5.3 Porcentaje de vitrificación

El principal efecto negativo de la propagación de tejidos vegetales en medios de cultivo líquidos, es la aparición de síntomas de vitrificación o hiperhidricidad en las plantas (Leifert y Waites, 1990; Leifert y Woodward, 1998; Leifert, 2000), ya que la disminución de la capacidad de llevar a cabo el proceso de fotosíntesis, la deformación de los tejidos y órganos, la pérdida de funcionalidad de los tejidos vasculares y el desbalance hormonal, nutricional y enzimático que se produce en la fisiología de las plantas afectadas, comprometen el normal desarrollo e incluso pueden llevar a la muerte de las mismas (Sutter, 1985; Ziv et al., 1987; Ziv, 1991a; Ziv, 1995a).

Una mayor sensibilidad a las condiciones de cultivo en medio líquido de las plantas de manzano frente a las de eucalipto, fue evidenciada en esta tesis mediante la evaluación de los síntomas de vitrificación que presentaban las plantas. Investigaciones anteriores (Chakrabarty, 2006), hablan de la importancia que esta problemática tiene en el cultivo del portainjerto M9 y respaldan los resultados recogidos en el presente trabajo.

Para prevenir la aparición de síntomas de vitrificación en los cultivos, se propuso desde el comienzo el uso de un precursor de la síntesis de lignina como lo es el floroglucinol (George, 1993), quien participa proveyendo de sus precursores en tejidos vitrificados que no sintetizan lignina o lo hacen a bajos niveles. Ross y Castillo, (2009), obtuvieron resultados positivos en cultivos de arándanos, donde la adición de este compuesto al medio de cultivo, previno la ocurrencia de brotes vitrificados y determinó mayores tasas de multiplicación.

5.3.1 Portainjerto M9

Desde el punto de vista de la vitrificación, el cultivo del manzano en el primer ensayo, fue totalmente inviable, ya que la totalidad de las plantas presentaron severos síntomas de hiperhidricidad, tanto en el sistema de inmersión temporal como en el de inmersión permanente, lo cual determinó que se replanteara el tratamiento con alternativas de menor frecuencias de inmersiones en los RITA[®] y de mayores concentraciones de floroglucinol en el caso de los BIP.

Esta disminución en la frecuencia de inmersiones del cultivo del M9 tuvo un mínimo efecto en el porcentaje de vitrificación, logrando plantas que no sobrevivieron a un nuevo repique o al pasaje a la fase de aclimatación, y por otro lado, disminuyó sensiblemente la tasa de proliferación, llevándola a valores de 3.4 y 2.5, con y sin el uso de floroglucinol respectivamente, sin presentar diferencias significativas con el nivel de proliferación observado en medio sólido, que en promedio fue de 2.9. Estos resultados desestimaron la posibilidad de seguir reduciendo la frecuencia de inmersiones.

En el caso de las plantas del portainjerto propagadas en los BIP, se observó que al aumentar la dosis del floroglucinol en el medio de cultivo de 40 mg/L a 80 mg/L, las plantas no mostraron una recuperación en cuanto a los síntomas de vitrificación y por el contrario, se evidenciaron efectos de toxicidad con necrosis de los tejidos. Frente a este nuevo resultado se decidió no probar con mayores dosis de floroglucinol.

Según George (1993), el floroglucinol interviene en la cadena de síntesis de lignina actuando con el ácido cumárico para continuar con la vía de la síntesis de lignina. El ácido cianamídico es un precursor del ácido cumárico y su síntesis se ve disminuida en condiciones de tejidos hiperhidratados, por lo cual la inclusión del floroglucinol al medio de cultivo no sería efectiva si los niveles de ácido cianamídico son bajos. Esta podría ser una explicación al hecho de que no se vieran resultados positivos en la disminución de la vitrificación frente al agregado del precursor de la síntesis de lignina.

En la búsqueda de una solución al problema de la vitrificación en el cultivo del manzano y frente a la imposibilidad de disminuir la frecuencia de inmersiones en los RITA[®] y de aumentar la dosis de floroglucinol, se propuso el uso de otros compuestos que pudieran disminuir los síntomas de la hiperhidricidad. Basándose en experiencias anteriores del equipo de investigación y en trabajos previos (Leonard et al., 2010), se decidió incorporar al medio de cultivo ácido cítrico y ácido ascórbico.

El efecto antioxidante del ácido ascórbico (Nagata, et al., 2003) y su participación como cofactor de la enzima APX (Smirnoff, 2000), servirían como alternativa para superar los efectos de la vitrificación, así como se ha reportado para diferentes condiciones de estrés ambiental (Smirnoff y Wheeler, 2000; Davey et al., 2000).

Por otro lado, el ácido cítrico con su capacidad de retardar la reacción de Fenton mediante la captura del ión Fe^{2+} y la formación de quelatos de hierro, que determina una menor regeneración del ión hidroxilo, así como el aporte de esqueletos carbonados que este ácido orgánico hace para la formación de celulosa que mejora la estructura de la pared celular, también podrían representar una estrategia efectiva para disminuir los efectos de la vitrificación.

A pesar de los antecedentes registrados por Leonard et al., (2010), con el agregado de ácido ascórbico en protocolos de criopreservación asociados a su función como antioxidante, este compuesto no tuvo efecto alguno sobre el cultivo del portainjerto M9, ni actuando solo, ni en forma conjunta con el ácido cítrico. Sin embargo, en esta tesis se encontró que el ácido cítrico sí tuvo un efecto reductor de los síntomas de la vitrificación en el portainjerto M9 para el caso de la propagación en los RITA, los cuales llegaron a un 30 % de tejidos vitrificados cuando se agregó una dosis de 100 mg de ácido cítrico por litro de medio de cultivo.

En el caso de la propagación en los BIP, ni el agregado de ácido cítrico ni ácido ascórbico tuvo efecto alguno en la disminución de los síntomas de la vitrificación, lo que llevó a no continuar con la investigación con portainjertos de manzano en BIP.

5.3.2 Eucalipto

En el caso del cultivo del eucalipto se partió tomando como base la experiencia recogida en el cultivo del portainjerto M9, por lo cual se decidió partir con las condiciones operativas que mejor resultado habían dado en este cultivo, de manera de comparar la respuesta de ambas especies en las mismas condiciones.

Una frecuencia de inmersión de 1 minuto cada 8 horas en los RITA[®] y una dosis de 40 mg de floroglucinol por litro fueron las propuestas planteadas para esta especie forestal. Desde el punto de vista de la vitrificación, los resultados fueron muy diferentes a los observados en el cultivo del manzano, ya que tanto en el sistema de inmersión temporal como en los BIP, el porcentaje de vitrificación fue del 10 %, no significando que el 10 % del total de las plantas estaban vitrificadas, sino que ese era el porcentaje de cada planta

que mostraba algún síntoma de hiperhidricidad, y este estaba asociado a las hojas mas viejas de la base de la planta. Este resultado no compromete ni la calidad ni la sobrevivencia de las plantas, permitiendo que estas soportaran un nuevo repique e incluso un pasaje a la fase de aclimatación.

Por otro lado se destaca que cuando estas plantas fueron repicadas al medio de cultivo sólido para evaluar el efecto residual del pasaje por medio líquido, estos mínimos síntomas de vitrificación se revirtieron, obteniéndose finalmente, plantas sin presencia de síntomas de hiperhidricidad.

Al igual que en el caso del cultivo del M9, el floroglucinol tampoco tuvo efecto sobre los síntomas de vitrificación, ya que este porcentaje de afección no varió entre los tratamientos con y sin agregado del precursor de la síntesis de lignina.

5.4 Estrés oxidativo en medio líquido

Más allá de la evaluación de los síntomas de la vitrificación por medio de la apreciación visual del porcentaje de las plantas o tejidos afectados, para este trabajo se planteó realizar la evaluación del estrés oxidativo que el cultivo en medio líquido genera sobre las plantas, mediante la medición de los TBARS, el cual resulta en un indicador del daño de la membrana celular por peroxidación lipídica (Leonard et al., 2010).

Se consideró la medición de la actividad de las enzimas SOD y catalasa con el fin de evidenciar la respuesta enzimática de las plantas frente a las condiciones de estrés oxidativo a las que estas fueron sometidas.

5.4.1 Daño celular en tejidos de plantas de M9

Frente a la situación de los daños y deformación de los tejidos del M9 en el cultivo en medio líquido, se procedió a evaluar el daño en la membrana celular por peroxidación lipídica y comparar los resultados entre tejidos de plantas sin síntomas de vitrificación, provenientes del cultivo en medio sólido, tejidos de partes de plantas sin síntomas de vitrificación que fueran cultivadas con y sin floroglucinol en los biorreactores de inmersión temporal y tejidos totalmente vitrificados, también provenientes de este último sistema de propagación.

Para la propagación en BIP no pudieron determinarse los TBARS por no lograrse tejidos sin síntomas de hiperhidricidad bajo estas condiciones de cultivo.

Se obtuvieron mayores niveles de TBARS en los tejidos sanos que en los tejidos vitrificados o los tejidos sin síntomas de vitrificación provenientes del medio líquido, lo cual indicaría un mayor daño celular de las plantas sin síntomas y sería opuesto a lo observado en el desarrollo de las plantas. Los valores de TBARS fueron inferiores a los reportados para otras especies como es el caso de *Pisum sativum* L. y *L. japonicus* (Iturbe-Ortmaetxe et al., 1998; Díaz et al., 2010)

Frente a este resultado, se planteó la hipótesis de que el daño de los tejidos de las plantas vitrificadas, así como el de los tejidos no vitrificados provenientes del medio líquido era de tal magnitud, que impidió su medición por este sistema.

Un dato útil a la hora de evaluar el ajuste del sistema de propagación, es que el agregado de floroglucinol no aportó ninguna mejoría frente a los daños por vitrificación.

Posteriormente se repitieron los análisis para los tratamientos con ácido cítrico y ácido ascórbico y se los comparó con los niveles de TBARS del control. De esta comparación solo pudo concluirse que al aumentar la dosis de ácido cítrico y el agregar ácido ascórbico al medio de cultivo, no tuvieron efecto que al agregar la mínima dosis de 50 mg/L de ácido cítrico.

La capacidad antioxidante de los distintos tejidos se realizó mediante la medición de la actividad de dos enzimas participantes en el proceso de destoxificación de las ROS que se generan en condiciones de estrés oxidativo.

5.4.2 SOD y CAT

La SOD constituye la primera fase de defensa antioxidante. Cataliza la reacción de dismutación del radical superóxido mediante su transformación en peróxido de hidrógeno, el cual puede ser metabolizado a su vez por las enzimas peroxidasas y CAT.

Por su participación en la defensa celular contra las ROS y por existir registros anteriores de que el nivel de actividad SOD aumenta frente a condiciones de estrés oxidativo debido a incremento de la concentración del radical superóxido (Borsani et al., 2001), fue que se procedió a medir la actividad de la SOD tanto en las plantas del portainjerto M9 como en las plantas de eucalipto.

5.4.2.1 Portainjerto M9

En el caso de las plantas de manzano, se midió la actividad de la enzima SOD en plantas vitrificadas, plantas provenientes del medio sólido sin síntomas de vitrificación y material vegetal no vitrificado proveniente del medio de cultivo líquido con y sin floroglucinol.

Los resultados mostraron que la actividad de la enzima era menor en las plantas que no mostraron síntomas de vitrificación, esto indicaría un nivel de estrés oxidativo menor que en el caso de materiales vegetales vitrificados, los cuales presentaron los valores más altos de actividad de la SOD. Una situación intermedia y sin diferencias significativas entre si, mostraron los tejidos no vitrificados pero que crecieron en medio líquido con y sin floroglucinol, lo cual muestra que estas, sin llegar a mostrar síntomas de hiperhidricidad, estaban en una situación de mayor estrés oxidativo que las plantas crecidas en medio sólido.

El anión superóxido llevaría a un aumento en la actividad SOD, la cual se relaciona directamente a condiciones de estrés oxidativo y coincide con investigaciones similares donde se estudió la relación entre la actividad de la SOD y niveles de estrés oxidativo causado por diferentes agentes como el déficit hídrico o por bajas temperaturas (Borsani, et al., 2001; Bonecarrere et al., 2011).

Al realizarse el análisis de la actividad de la enzima CAT en las plantas del portainjerto de manzano creciendo en un medio de cultivo adicionado con ácido cítrico y ácido ascórbico, pudo verse que los valores de los diferentes tratamientos no presentaron diferencias significativas entre si.

5.4.2.2 Eucalipto

Cuando se analizaron los resultados de la medición de la actividad SOD en los diferentes tratamientos propuestos para el desarrollo de las plantas de eucalipto, se observó que las plantas que crecieron en medio sólido, las que crecieron en los BIP con y sin floroglucinol y en los biorreactores de inmersión temporal también con y sin floroglucinol, mostraron los valores mas bajos y sin diferencias significativas entre ellas en este parámetro. Por el contrario, las plantas que luego de haber crecido en medio líquido, volvieron a ser cultivadas en condiciones de medio sólido, mostraron los valores más altos

y con diferencias significativas con respecto a los primeros, estos valores indicarían una mayor situación de estrés en el cambio del medio líquido al medio sólido.

La explicación a este resultado podría ser que las plantas pasan de un medio líquido, en donde los nutrientes son absorbidos por toda la superficie de la planta que se encuentra sumergida en el medio, a absorber nutrientes solo en la parte de la planta que está en contacto con el medio de cultivo, y el flujo de los nutrientes al interior de la planta es más limitado, todo esto podría derivar en un estrés nutricional.

El aumento de actividad SOD podría deberse a un estrés generado por la adaptación de las plantas a la transferencia al medio sólido y no a una situación de hiperhidricidad de los tejidos.

5.5 Mejoras comparativas del sistema de producción

El objetivo general de la tesis fue mejorar la tasa de multiplicación en medio líquido para propagar *in vitro* masivamente plantas leñosas de interés comercial. En la búsqueda de este objetivo, tres aspectos fundamentales eran necesarios para hacer de esta, una técnica que pudiera aplicarse a nivel comercial y que tuviera ventajas comparativas con el sistema de propagación en medio sólido.

Las ventajas que el sistema de propagación en medio líquido debe presentar frente al sistema convencional, son que con el sistema propuesto se obtengan plantas de calidad genético sanitarias que compitan con el producto obtenido mediante el cultivo en medio sólido, con una tasa de multiplicación igual o superior a la obtenida por el sistema en medio sólido, y tener menores costos de producción, sobre todo para situaciones como las de Uruguay, donde los costos de producción de plantas micropropagadas es la principal limitante para imponer este sistema de cultivo.

Una principal vía para disminuir costos de producción es la ausencia de compuestos gelificantes en el medio de cultivo, el agar es el elemento que permite la solidificación del medio de cultivo y es uno de los componentes más costosos del mismo. Los medios de cultivo líquidos, desde este punto de vista ya son menos costosos en su composición.

Otro aspecto fundamental para la disminución de costos en la formulación del medio de cultivo es la dilución propuesta para la propagación en los biorreactores, en donde las concentraciones de sales minerales, vitaminas, sacarosa y reguladores de crecimiento del M9 se diluyeron a un cuarto de la utilizada en medio sólido, mientras que

para el eucalipto, la dilución de sales minerales, vitaminas y sacarosa fue a la mitad y los reguladores de crecimiento se diluyeron a una décima parte.

Los períodos de tiempo que se demora entre un repique y otro, es un factor muy importante dentro del costo de producción ya que esto determina el costo de la mano de obra utilizada. Mediante el uso de los biorreactores este tiempo se prolongó a prácticamente el doble, ya que en el cultivo en medio sólido, los repiques de estas especies trabajadas no debe ser superior a los 15 o 20 días, y en el caso de los biorreactores para este ensayo se repicaron las plantas con un intervalo de 30 días resultando, la mano de obra, un elemento determinante de los costos totales de la propagación in vitro. Análisis económicos que respaldan estas observaciones fueron realizadas por otros autores (Paek et al., 2005).

En el caso del portainjerto M9, la tasa de multiplicación lograda en la mejor de las situaciones, con un porcentaje de vitrificación que permita repicar las plantas a medio sólido, fue de 3.4, sin diferencias estadísticamente significativas con el 2.9 obtenido en la propagación en medio sólido, lo cual puede ser tenido en cuenta como un resultado positivo, ya que durante el pasaje a medio líquido, la reducción de costos por la elaboración de los medios, hace que la ecuación económico-productiva mejore.

En el caso de los eucaliptos, la relación costo-beneficio fue aun mejor, ya que disminuyeron los costos de mano de obra y de elaboración del medio de cultivo, y por otro lado, la tasa de multiplicación pasó de un promedio de 3 en medio sólido a un promedio de 18 en el caso de los BIP, con lo cual se obtiene un sistema de producción que genera mayor cantidad de plantas con menos costos de producción.

6 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, permiten sacar las siguientes conclusiones:

- La propagación en medio líquido aumenta significativamente la tasa de proliferación del portainjerto M9 de *Malus domestica* y del clon de *Eucalyptus grandis*, en relación a la propagación en medio sólido, siendo a su vez superior en los BIP en relación a los RITA[®].
- El medio líquido induce a una mayor tasa de proliferación en las plantas de eucalipto cuando estas son transferidas a medio sólido.
- La modificación de la frecuencia de inmersiones en la propagación del portainjerto M9, no tiene un efecto significativo en la disminución de la vitrificación, pero si sobre la tasa de proliferación.
- El agregado de floroglucinol al medio de cultivo no tiene efecto en la disminución de la vitrificación en ninguna de las dos especies proliferadas.
- El ácido cítrico en el medio de cultivo disminuye los síntomas de vitrificación en la propagación del portainjerto M9, mientras que el ácido ascórbico no tiene ningún efecto.
- La actividad de la enzima SOD parece estar relacionada con una mayor vitrificación del portainjerto M9.

7 BIBLIOGRAFIA

Adelberg J and Simpson E. 2002. Intermittent Immersion Vessel apparatus and Process for Plant Propagation. Internl. S/N: PCT/US01/06586.

Agius F, Botella M and Valpuesta V. 2006. Vitamin C: Nutritional and biological significance, biosynthesis, molecular biology and metabolic engineering. In: Metabolic Engineering and Molecular Farming. Studium Press pp 159-188.

Agius F, González-Lamote R, Ccaballero J, Muñoz-Blanco J, Botella M and Valpuesta V. 2003. Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D galacturonic acid reductase. Nat. Biotech. 21:177-181.

Aitken-Christie J, Kozai T, and Takayama S. 1995. Automation in plant tissue culture. General introduction and overview. In: Aitken-Christie, Kozai T, and Smith (eds.), Automation and environment control in plant tissue culture. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, The Netherlands. p.1-18

Aitken-Christie J. 1991. Automation. In: P. C. Debergh and R. H. Zimmerman (eds.), Micropropagation: Technology and application. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, The Netherlands. p. 363-388.

Alper Y, Young J, Adelberg W, and Rohdes B. 1993. Mass handling of watermelon microcutting. ASAE meeting, Paper, 93-1019.

Alvard D, Cote F, and Teisson C. 1993. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Plant Cell, Tissue Organ Culture 32:55-60.

Ammirato P and Styer D. 1985. Strategies for large scale manipulation of somatic embryos in suspension culture. In: Zaitlin M, Day P, and Hollaender A. (eds.), Biotechnology in plant science: Relevance to agriculture in the eighties. Academic Press, New York. p. 161-178.

Ammirato P. 1985. Patterns of development in culture. In: Henke R, K. Hughes K, Constantin M, and Hollaender A (eds.), Tissue culture in forestry and agriculture. Plenum Publ., New York. p. 9-29.

Archambault J, Lavoie L, Williams R and Chavarie C. 1995. Nutritional aspects of *Daucus carota* somatic embryo cultures performed in bioreactors. In: Terzi M, Cella R and Flavinga A (eds.), Current issues in plant molecular and cellular biology. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, The Netherlands. p. 681-687.

Archambault J, Williams R, Lavoie L, Pepin and Chavarie C. 1994. Production of somatic embryos in a helical ribbon impeller bioreactor. Biotech. Bioengin. 44:930-943.

Attree S, Pomery M and Fowke L. 1994. Production of vigorous, desiccation tolerant white spruce [*Picea glauca* (Moench.) Voss.] synthetic seeds in a bioreactor. Plant Cell Rep. 13:601-606.

- Beers R and Sizer I. 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* 195:133-140.
- Bhatt B. and Todaria P. (1990). Vegetative propagation of tree species of social forestry value in Garhwal Himalaya. *J. tropical forest Sci.*, 2: 195-210.
- Bonecarrere V, Borsani O, Díaz P, Capdevielle F, Blanco P and Monza J. 2011. Response to photooxidative stress induced by cold in japonica rice is genotype dependence. *Plant Sci.* 180:726-732.
- Bornman C and Vogelmann T. (1984) Effect of rigidity of gel medium on benzyl adenine induced adventitious bud formation and vitrification in vitro in *Picea abies*. *Physiol. Plant.* 61: 505-512
- Borsani O, Díaz P, Agius F, Valpuesta V and Monza J. 2001. Water stress generates an oxidative stress through the induction of a specific Cu/Zn superoxide dismutase in *Lotus corniculatus* leaves. *Plant Sci.* 161,757-63.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Cazzulino D, Pederson H and Chin C. 1991. Bioreactors and image analysis for scale-up and plant propagation In: *Cell culture and somatic cell genetics of plants* Vasil I (ed.), Academic Press, San Diego, CA. . p. 147–177.
- Chakrabarty D, Hahn E, Yoon Y, Paek K. 2003 Micropropagation of apple rootstock M9 EMLA using bioreactor. *J. Hort. Sci. Biotech.* 78, 605-609.
- Chen T, Thompson B and Gerson D. 1987. In vitro production of alfalfa somatic embryos in fermentation systems. *J. Ferment. Technol.* 65:353–357.
- Costa Galvão V, Karam Teixeira F, Menezes-Benavente L and Margis-Pinheiro M. 2005. Multigene families encode the major enzymes of antioxidant metabolism in *Eucalyptus grandis* L. *Genetics and Molecular Biology*, 28, 3 (suppl), 529-538
- Daguin F. and Letouze R. (1985) Relations entre hypolignification et état vitreux chez *Salix babylonica* en culture in vitro. Rôle de nutrition ammoniacale. *Can. J. Bot.* 63: 324-326.
- Davey M, Van Montagu M, Inzé S, Sanmartín M, Kanellis A, Smirnoff N, Benzie I, Strain J, Favell D and Fletcher J. 2000. Plant L-ascorbic acid: Chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *J. Sci. Food Agric.* 80:825-860.
- Debergh P and Maene L. 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Horticulturae* 14, 335-345.
- Debergh P, Aitken-Christie J, Cohen B, Von Arnold S, Zimmerman R and Ziv M. 1992. Reconsideration of the term “vitrification” as used in micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 30:135–140.

- Del Río L, Corpas J, Sandalio L, Palma J and Barroso J. 2003. Plant peroxisomes, reactive oxygen metabolism and nitric oxide. *IUBM Life* 55:71-81.
- Diamantidis G, Molassiotis A, Sotiropoulos T, Tanou G, Kofidis G and Therios I. 2006. Antioxidant and anatomical responses in shoot culture of the apple rootstock MM 106 treated with NaCl, KCl, mannitol or sorbitol. *Biologia plantarum* 50 (3): 331-338
- Díaz P, Betti M, Sánchez D, Udvardi M, Monza J and Márquez A. 2010. Deficiency in plastidic glutamine synthetase alters proline metabolism and transcriptomic response in *Lotus japonicus* under drought stress. *New Phytologist*. 188: 1001-1013.
- Doran P. 1993. Design of reactors for plant cells and organs. In: A Feichter (ed.), *Bioprocess Design Control*, Vol. 48. Springer-Verlag, Berlin. p. 116-169.
- Driver, D. and Kuniyuki, D. 1984. *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. *HortScience*, 19: 507-509.
- Encuesta frutícola de hoja caduca Zafra 2009/10 Serie Encuestas Septiembre, 2010 N° 294 MGAP-DIEA
- Etienne H and Berthouly M. (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation (review). *Plant Cell Tissue Organ cult.* 69:215-231.
- Etienne H, Lartaud M, Michaux-Ferrière N, Carron M, Berthouly M, and Teisson C. 1997. Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.) using the temporary immersion technique. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 33:81-87.
- FAO/IAEA 2004. Low cost options for tissue culture technology in developing countries. Proceedings of a Technical Meeting organized by the Joint Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture and held in Vienna, 26-30 August 2002 February 2004
- Gaspar T. 1991. Vitrification in micropropagation. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol 17. High-tech and Micropropagation I (Baiaj Y P S ed). Berlin: Springer-Verlag
- George E. 1993. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Part 1. The Technology. Exegetics Ltd., Edington
- Gil G. 2000. *Fruticultura: el potencial productivo, crecimiento vegetativo y diseño de huertos y viñedos*. 3° ed. Ediciones Universidad católica de Chile, Santiago, Chile.
- Guan B, Gertner G and Parysow P. 1997. A framework for uncertainty assessment of mechanistic forest growth models: a neutral network example. *Ecol. Model.* 98: 47-58
- Guri A and Patel K. 1998. Compositions and methods to prevent microbial contamination of plant tissue culture media. U. S. Patent No. 5,750,402
- Hauptmann N and Cadenas E. 1997. The oxygen paradox: Biochemistry of active oxygen. In: *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. J. Scandalios (Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp1-20.

Hegarty P, Smart N, Scragg H and Fowler M. 1986. The aeration of *Catharanthus roseus* L.G. Don suspension cultures in airlift bioreactors: the inhibitory effect at high aeration rates on culture growth. *J. Expt. Bot.* 37:1911–1920.

Heyerdahl P, Olsen O and Hvoslef-Eide A. 1995. Engineering aspects of plant propagation in bioreactors. In: Aitken-Christie J, Kozai T, and Smith M (eds.), *Automation and environment control in plant tissue culture*. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, The Netherlands. p. 87–123.

Holdgate D and Zandvoort E. 1997. Strategic considerations for the establishment of microorganism free tissue cultures for commercial ornamental micropropagation. In: *Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation*. Cassells, A.C. (Ed.) Kluwer Acad. Pub. Dordrecht. Pp.15-22.

Hvoslef-Eide A and Munster C. 1998. Somatic embryogenesis of *Cyclamen persicum* Mill. in bioreactors. *Comb. Proc. Int. Plant Prop.* 47:377–382.

Ilan A, Ziv M and Halevy A. 1995. In vitro propagation in liquid culture and acclimatization of *Brodiaea*. *Scientia Hort.* 63:101–112.

Iturbe-Ortmaetxe, Escuredo P, Arrese-Igor C, and Becana M. Oxidative Damage in Pea Plants Exposed to Water Deficit or Paraquat. *Plant Physiol.* (1998) 116: 173–181.

Jay V, Genestier S and Courduroux J. 1994. Bioreactor studies on the effect of medium pH on carrot (*Daucus carota* L.) somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 36:205–209.

Jones J and Sluis C. (1991). Marketing of micropropagated plants. In Debergh P and Zimmerman R, (ed), *mac Millan New York*. p: 141-54.

Kanematsu S, Iriguchi N and Ienaga A. 2010. Characterization of CuZn-superoxide dismutase gene from the green alga *Spirogyra* sp. (Streptophyta): Evolutionary implications for the origin of the chloroplastic and cytosolic isoforms. *Bull. Minamikyushu Univ.* 40A: 65-77

Kevers C and Gaspar. 1986. Vittrification of carnation in vitro: changes in water content, extracellular space, air volume, and ions levels. *Physiol. Vég.*, 24, 647-653.

Kim D, Pederson H and. Chin C. 1991. Cultivation of *Thalictrum rugosum* cell suspension in an improved airlift bioreactor: stimulatory effects of CO₂ and C₂H₄ on alkaloid production. *Biotech. Bioengin.* 38:331–339.

Kozai T, Fujiwara K, Hayashi M, and Aitken-Christie J. 1992. The in vitro environment and its control in micropropagation. In: Kurata K and Kozai T, *Transplant production systems*. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, The Netherlands. p. 247–282.

Leathers R, Smith M, and Aitken-Christie J. 1995. Automation of the bioreactor process for mass propagation and secondary metabolism. In: J. Aitken- Christie, Kozai T, and Smith M (eds.), *Automation and environment control in plant tissue culture*. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, The Netherlands. p. 187–214.

Leifert C and Waites W. 1990. Contaminants of plant tissue culture. Internl. Assoc. Plant Tiss. Cult. Newsl. 60: 2-13.

Leifert C and Woodward S. 1998. Laboratory contamination management: the requirement for microbiological quality assurance. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 52: 83-88.

Leifert C. 2000. Quality Assurance Systems for Plant Cell and Tissue Culture: The problem of Latent Persistence of Bacterial Pathogens and Agrobacterium Transformed vector systems. In. Proc. Intl. Symp. Methods and Markers For Quality Assurance in Micropropagation. A.C. Cassells et al. (Eds.) Acta. Hort. p. 530.

Leonard S, Uchendu E, Traber M, Reed B. 2010. Vitamins C and E improve regrowth and reduce lipid peroxidation of blackberry shoot tips following cryopreservation. Plant Cell Rep 29:25–35

Levin R, Alper Y and. Watad A. 1997. Methods and approaches for liquid media and semi-automated micropropagation. Acta Hort. 447:659–663.

Levin R, Gaba V, Tal B, Hirsch S, Denola D and Vasil I. 1988. Automated plant tissue culture for mass propagation. Bio/Technology 6:1035–1040.

Li Y, Bachas L and Bhattacharyya D. 2005. Kinetic studies of trichlorophenol destruction by chelate-based Fenton reaction. Environ. Eng. Sci. 22:756-771.

Lin S, Zhang Z, Lin Y, Liu W, Guo H, Zhang W and Zhang C. 2004. Comparative study on antioxidative system in normal and vitrified shoots of *Populus suaveolens* in tissue culture. Forest. Sud. China 6:1-8

Lloyd, G. and MC Cown, B. 1981. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc., 30: 421-427.

Lulsdorf M, Tautorius T, Kikcio S, Bethune T and Dunstan D. 1993. Germination of encapsulated embryos of interior spruce *Picea glauca-engelmanni* complex) and black spruce (*Picea mariana* Mill.). Plant Cell Rep. 12:385–389.

McAlister B, Finnie J, Watt M and Blakeway F. 2005. Use of the temporary immersion bioreactor system (RITA^R) for production of commercial Eucalyptus clones in Mondi Forests (SA). Plant Cell Tissue and Organ Culture 81(3):347-358.

McCord J and Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). J. Biol. Chem. 244:6049–6055

Mehrotra, S., Manoj, G., Arun, K., Bhartendu, M. 2007. Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization. African Journal of Biotechnology 6 (13): 1484-1492.

Merchuk J. 1990. Why use air-lift bioreactors? Trends Biotech. 8:66–71.

Minotti G and Aust S. 1987: The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 262:1098-1104.

Mittler R and Zilinskas A. 1994. Regulation of pea cytosolic ascorbate and other antioxidants enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. *Plant J.* 5:397-405.

Munné S and Alegre I. 2002. Interplay between ascorbic acid and lipophilic antioxidant defences in chloroplasts of water stressed *Arabidopsis* plants. *FEBS Letters* 524:145-148.

Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473-497

Nagata T, Todoriki S, Masumizu T, Suda I, Furuta S, Du Z and Kikuchi S. 2003. Levels of active oxygen species are controlled by ascorbic acid and antocyanin in *Arabidopsis*. *J. Agric. Food Chem.* 51:2992-2999.

Osmotec, 2002. The Osmotec Life Line. Advanced products for plant tissue culture.

Paek K, Chakrabarty and Hahn E, 2005. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 81: 287-300

Palhares G, Rodriguez R, Cid M, Pina D and Gonzalez-Olmedo J. 2004. Efecto de un análogo de brasinoesteroides (MH5) en la propagación de *Eucalyptus urograndis* en biorreactores de inmersión temporal. *Cultivos tropicales*. Vol 25 no 1, 39-44

Paque M and Boxus P. 1987. Vitrification: a phenomenon related to tissue water content. *Acta Hort.* 212:245-252.

Paque M, Bercetche J and Dumas E. 1992. Liquid media to improve and reduce the cost of in vitro conifer propagation. *Acta Hort.* 319:95-100.

Pastori M, Kiddle G, Antoniow J, Bernard S, Veljovic-Javanovic S, Verrier P, Noctor G and Foyer C. 2003. Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signalling. *Plant Cell* 15:939-951.

Preece J and Sutter E. 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse. In: Debergh P and Zimmerman R (eds.), *Micropropagation: Technology and application*. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, The Netherlands. p. 71-91.

Preil W. 1991. Application of bioreactors in plant propagation. In: Debergh P and Zimmerman R (eds.), *Micropropagation: Technology and application*. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, The Netherlands. p. 425-455.

Rodríguez-Serrano M, Martínez-de la Casa N, Romero-Puertas M, del Río L, Sandalio L. (2008). Toxicidad del Cadmio en Plantas. *Ecosistemas* 17(3):139-146.

Ross S y Castillo A. 2009. Mass propagation of *Vaccinium corymbosum* in bioreactors. *Agrociencia*. Vol 13 N° 2 p. 1 - 8

- Rustérucci C, Stallaert V, Milat M, Pugin A, Ricci P and Blein J. 1996. Relationship between active oxygen species, lipid peroxidation, necrosis, and phytoalexin production induced by elicitors in *Nicotiana*. *Plant Physiol.* **111**:885-891.
- Sainz M, Díaz P, Monza J and Borsani O. 2010. Heat stress results in loss of chloroplast Cu/Zn superoxide dismutase and increased damage to photosystem II in combination drought-heat stressed *Lotus japonicus*. *Physiol. Plant.* 140:46-56
- Sánchez Rodríguez M, Santiago-Osorio E, Vargas L, Mendoza-Núñez V. 2004. Propuesta de un constructo para evaluar integralmente el estrés oxidativo, *Bioquímica* 29: 81-90
- Scragg A. 1992. Large-scale plant cell culture: methods, applications and products. *Current Opinion Biotech.* 3:105–109.
- Smart N and Fowler M. 1984. An airlift column bioreactor suitable for large-scale cultivation of plant cell suspensions. *J. Expt. Bot.* 35:531–537.
- Smirnoff N and Wheeler G. 2000. Ascorbic acid in plants: Biosynthesis and function in photoprotection. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 355:1455-1464.
- Steward F, Ammirato P and Mapes M. 1970. Growth and development of totipotent cells; some problems, procedures and perspectives. *Ann. Bot.* 34:761–787.
- Stuart D, Strickland S and Walker K. 1987. Bioreactor production of alfalfa somatic embryos. *HortScience* 22:800–803.
- Sun Y. and Pignatello J. 1992. Chemical treatment of pesticide wastes. Evaluation of Fe (III) chelates for catalytic hydrogen peroxide oxidation of 2,4 D at circumneutral pH. *J. Agr. Food Chem.* 40:322-327.
- Sutter E. 1985. Morphological physical and chemical characteristics of epicuticular wax on ornamental plants regenerated in vitro. *Ann. Bot.* 55:321–329.
- Takayama S and Akita M. 1994. The types of bioreactors used for shoots and embryos. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 39: 147-156.
- Takayama S and Akita M. 1998. Bioreactor techniques for large-scale culture of plant propagules. *Adv. Hort Sci.* 12:93–100.
- Takayama S. 1991. Mass propagation of plants through shake and bioreactor culture techniques. In: Bajaj Y (ed.), *Biotechnology in agriculture and forestry: Hightech and micropropagation*. Vol. 17. Springer-Verlag, Berlin. p. 1–46.
- Tautorus T and Dunstan D. 1995. Scale-up of embryogenic plant suspension cultures in bioreactors. In: Jain M., Gupta P and Newton R (eds.), *Somatic embryogenesis in woody plants*. Vol. 1. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, The Netherlands. p. 265–269.
- Teisson C and Alvard D. 1995. A new concept of plant in vitro cultivation liquid medium: temporary immersion. In: Terzi M et al. (eds.), *Current issues in plant molecular and cellular biology*. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, The Netherlands. p. 105–110.

- Ushiyama K. 1988. Large scale culture techniques of plant cells the secondary metabolite production. *Hakko to Kogyo* 46: 7-11.
- Vasil I. 1994. Automation of plant propagation. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 39:105–108.
- Venereo G. 2002. Daño Oxidativo, Radicales Libres y Antioxidantes. *Rev. Cubana Med. Milit.* 31(2):126-33
- Vieitez A., Ballester A., SanJose M.C. and Vieitez E. (1985) Anatomical and chemical studies of vitrified shoots of chestnut regenerated in vitro. *Physiol. Plant.* 65: 177-184.
- Walling C. 1975. Fenton`s reagent revisited. *Accounts Chem. Res.* 8:125
- Weathers P, Cheetham R and Giles K. 1988. Dramatic increases in shoot number and length for Musa, Cordyline, and Nephrolepis using nutrient mists. *Acta. Hort.* 230: 39-44.
- Werker E and Leshem B. 1987. Structural changes during vitrification of carnation plantlets. *Ann. Bot.* 59:377–385.
- Williams R. 1992. Towards a model of mineral nutrition in vitro. In: Kurata K and Kozai T (eds.), *Transplant production systems*. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, The Netherlands. p. 213–229.
- Wolucka B and Van Montagu M. 2003. GDP-mannose 3 5 epimerase forms GDP-gulose, a putative intermediate for *de novo* biosynthesis of vitamin C in plants. *J. Biol. Chem.* 48:47483-47490.
- Zakaria Ahmed, Firoza Akhter M, Shamsul Haque, Hasina Banu, Motiur Rahman and Faruquzzaman A. 2001. Novel Micropropagation System *OnLine Journal of Biological Sciences Asian Network for Scientific Information.* 1 (11): 1106-1111
- Ziv M and Shemesh D. 1996. Propagation and tuberization of potato bud clusters from bioreactor culture. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 32:31–36. Ilan A, Ziv M and Halevy A. 1995. In vitro propagation in liquid culture and acclimatization of Brodiaea. *Scientia Hort.* 63:101–112.
- Ziv M. 1990. Morphogenesis of gladiolus buds in bioreactors—implication for scaledup propagation of geophytes. In: Nijkamp H, van der Plas and van Aatrijk J (eds.), *Progress in plant cellular and molecular biology*. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, The Netherlands. p. 119–124.
- Ziv M. 1991a. Vitrification: Morphological and physiological disorders of in vitro plants. In: Debergh P and Zimmerman R (eds.), *Micropropagation: Technology and application*. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, The Netherlands. p. 45–69.
- Ziv M. 1991b. Morphogenic pattern of plants in liquid medium in shaken flasks or large scale bioreactor cultures. *Israel J. Bot.* 40:145–153.
- Ziv M. 1992a. Morphogenic control of plants micropropagated in bioreactor cultures and its possible impact on acclimatization. *Acta Hort.* 319:119–124.

Ziv M. 1992b. The use of growth retardants for the regulation and acclimatization of in vitro plants. In: Karssen C., Van Loon L and Vreugdenhil D (eds.), Progress in plant growth regulation. Current Plant Sci. Biotech. in Agric., Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, The Netherlands. p. 809–817.

Ziv M. 1995. The control of bioreactor environment for plant propagation in liquid culture. Acta Hort. 319:25–38.

Ziv M. 1999. Organogenic plant regeneration in bioreactors. In: Plant Biotechnology and In Vitro Biology in the 21st Century. Altman A, Ziv M and Izhar S. (Eds.) Kluwer Acad. Publ. Dordrecht. p.673- 676.

Ziv M. 2000. Bioreactor technology for plant micropropagation. Hort. Rev. 24: 1-30.

Ziv, M y Hadar A (1991) Morphogenic patterns of plants micropropagated in shaken flasks or large scale bioreactor cultures. Israeli Journal of Botany 40: 145-153.

Ziv, M., N. Hertz and Y. Biran, 1983. Vegetative reproduction of *Allium ampeloprasum* L. in vivo and in vitro. Israel J. Bot., 32: 1-9.