



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

DESARROLLO DE UN PROTOTIPO DE SISTEMA DE INMERSIÓN  
TEMPORAL UTILIZANDO *NICOTIANA TABACUM* COMO  
MODELO EXPERIMENTAL

Autores

María Isabel Camposano Jaramillo  
Christopher Oscar Ibarra Ayala

Año  
2019



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

DESARROLLO DE UN PROTOTIPO DE SISTEMA DE INMERSIÓN  
TEMPORAL UTILIZANDO *NICOTIANA TABACUM* COMO MODELO  
EXPERIMENTAL

“Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos  
establecidos para optar por el título de Ingenieros en Biotecnología”

Profesor guía

MSc. Fernando Xavier Rivas Romero

Autores

María Isabel Camposano Jaramillo

Christopher Oscar Ibarra Ayala

Año

2019

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo, Desarrollo de un prototipo de sistema de inmersión temporal utilizando *Nicotiana tabacum* como modelo experimental, a través de reuniones periódicas con los estudiantes María Isabel Camposano Jaramillo y Christopher Oscar Ibarra Ayala, en el semestre 201910, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

---

Fernando Xavier Rivas Romero  
Máster en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas  
CI: 1718092701

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, Desarrollo de un prototipo de sistema de inmersión temporal utilizando *Nicotiana tabacum* como modelo experimental, de María Isabel Camposano Jaramillo y Christopher Oscar Ibarra Ayala, en el semestre 201910, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

---

María Alejandra Cruz Salazar  
Máster en Ingeniería en Bioprocesos y Biotecnología  
CI: 1719928572

## **DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE**

“Declaramos que éste trabajo es original, de nuestra autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

---

María Isabel Camposano Jaramillo  
CI: 1716511082

---

Christopher Oscar Ibarra Ayala  
CI: 1723122683

## **AGRADECIMIENTOS**

Al MSc. Fernando Rivas, quien con paciencia nos guió durante la realización del presente trabajo de titulación y sin el cual no se habría podido llevar a cabo.

Al estudiante de Ing. Electrónica y Redes de la UDLA André Torres, quien con su ingenio programó satisfactoriamente la parte electrónica del prototipo y al Ing. Santiago Solorzano, quien nos ayudó con el prototipado e impresiones 3D.

A la Ing. Jeanelly Grijalva y el Ing. Diego Valdospinos, quienes fueron una importante guía en el presente trabajo.

A la Universidad de las Américas por permitirnos utilizar las instalaciones del UITEC y el laboratorio (LQ34).

## **DEDICATORIA**

A Dios, quien ha sido nuestro mayor apoyo y fortaleza durante toda nuestra carrera universitaria.

A nuestra familia, quienes con paciencia, inspiración y amor nos han sabido guiar y acompañar en el proceso.

A nuestros amigos, quienes son parte importante de nuestras vidas por su amistad incondicional y confianza.

## RESUMEN

Los sistemas de inmersión temporal (SIT's) se han diseñado y automatizado como una herramienta útil para proveer condiciones de desarrollo óptimas que brinden entornos adecuados para el desarrollo del material vegetal. Existen numerosos beneficios sobre el uso de SIT's en comparación a la propagación *in vitro* convencional; entre ellos la mejor disposición de nutrientes, una óptima transferencia de gases, la reducción de trastornos fisiológicos, la preservación de la integridad morfológica de los explantes, entre otros. Utilizando un mecanismo, el cual sumerge a los explantes en medio líquido por intervalos programados, luego de los cuales se pasa a una fase de desecación, donde estos permanecerán la mayor parte del tiempo. A lo largo de la historia se han desarrollado numerosos SIT's, para los cuales se han utilizado distintos cultivos con el fin de probar el óptimo funcionamiento de los mismos y favorecer a la micropropagación *in vitro* de las distintas especies vegetales. En el presente estudio se utilizó como modelo experimental a *Nicotiana tabacum*, por ser una planta modelo en investigación científica. La cual, actualmente es cultivada alrededor del mundo por su alto valor comercial, principalmente como componente del tabaco. Los objetivos del presente estudio fueron el diseño de un sistema de inmersión temporal con capacidad de regulación del tiempo de inmersión según los requerimientos de la planta y la validación de las condiciones de cultivo *in vitro* a partir de yemas de *Nicotiana tabacum* en el sistema de inmersión diseñado. Para lo cual, se utilizaron yemas axilares de *N. tabacum* de material vegetal esterilizado. El SIT estuvo programado para dos tiempos de inmersión (5 min y 15 min) y dos frecuencias de inmersión (3 h y 8 h). Las variables de respuesta estudiadas fueron el número de hojas, longitud de brote y coeficiente de multiplicación. El experimento se corrió durante un periodo de 7 días, en los cuales se comprobó un correcto funcionamiento del SIT. Además, no presentó contaminación, hiperhidricidad, ni oxidación en los explantes. Se determinó que el mejor tratamiento del experimento fue el 6 con 15 g de sacarosa, 0.5x de medio de cultivo basal Murashige y Skoog (MS), 40 mL/explante, 28 °C y un tiempo de inmersión de 5 min cada 8 h. Sin embargo,

para algunas variables de respuesta no hubo mayor diferencia entre el tratamiento 6 y los demás.

Palabras clave: SIT, *Nicotiana tabacum*, prototipo.

## ABSTRACT

Temporary immersion systems (SIT's) have been designed and automated as a useful tool to provide optimal development conditions that supplies adequate environments for the development of the explant. Some benefits over the use of SIT compared to conventional *in vitro* propagation are: best provision of nutrients, better gases transfer, a physiological disorders reduction, preservation of morphological explants integrity, among others. There was used a mechanism that used scheduled intervals for immersion in liquid médium, that then goes to a drying phase, where these will stay most of the time. Throughout history, many SITs have been developed, for which different crops have been used in order to test their optimal functioning and also to favor *in vitro* micropropagation of the different plant species. In the present study, *Nicotiana tabacum* was used as an experimental model, as it is a model plant in scientific research. Which is currently cultivated around the world because of it high commercial value, mainly as tobacco component. Main objectives of the present study were the design of the temporary immersion system with the capacitance of regulate the immersion time according to the requirements of the plant and the validation of *in vitro* culture conditions from *Nicotiana tabacum* buds in the designed immersion system. For which, axillary buds of *N. tabacum* of a sterile plant material were used. The SIT was programmed for two immersion times (5 min and 15 min) and two immersion frequencies (3 h and 8 h). The studied response variables were: leaves number, shoot length and multiplication coefficient. The experiment was run during a period of 7 days, in which the correct functioning of the SIT was verified. In addition, there were no explants contamination, hyperhydricity, or oxidation. It was determined that the best treatment of the experiment was 6 with 15 g of sucrose, 0.5 x MS, 40 mL / explant, 28 °C and an immersion time of 5 min every 8 h. However, for some response variables there were no greater difference between treatment 6 and the others.

Key words: TIS, *Nicotiana tabacum*, prototype.

# INDICE

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes .....	1
1.2. Planteamiento del problema.....	3
1.3. Objetivo general. ....	4
1.4. Objetivo Específicos.....	5
1.5. Justificación de la investigación.....	5
2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	6
2.1. Sistemas de inmersión temporal .....	6
2.1.1. Concepto .....	6
2.1.2 Historia y desarrollo .....	7
2.1.3. “Recipiente de inmersión temporal automático” <i>RITA</i> <sup>®</sup> .....	9
2.1.4. <i>Biorreactor de inmersión temporal de frascos gemelos:</i> “ <i>BIT Cubano</i> ” .....	10
2.1.5. Sistema de inmersión temporal: “ <i>Ebb-and-Flow</i> <sup>®</sup> ” .....	12
2.1.6. Sistema de inmersión temporal: “ <i>Thermo-Photo-Biorreactor</i> <sup>®</sup> ” .....	14
2.1.7. Sistema de inmersión por burbujas (BIB) .....	15
2.1.8. Biorreactores desechables .....	17
2.1.9. Condiciones de operación de un SIT .....	18
2.1.10. Factores que afectan el crecimiento de plantas en un SIT .....	19
2.1.10.1. Velocidad de cizalla.....	19
2.1.10.2. Temperatura.....	20
2.1.10.3. Intensidad de luz y fotoperiodo.....	20
2.2. Impresión 3D.....	21
2.2.1. Modelado por deposición fundida (FDM) .....	21
2.2.2. Prototipado rápido.....	22
2.2.3. Materiales comunes utilizados en FDM .....	23
2.2.4. Termoplástico .....	23
2.2.5. Impresiones 3D como herramientas para el desarrollo de prototipos biológicos. ....	26

2.2.7.1. Herramientas manuales.....	27
2.3. <i>Nicotiana tabacum</i> .....	29
2.3.1. Descripción botánica.....	29
2.3.2. El tabaco como modelo de estudio en Biotecnología Vegetal .....	31
3. CAPÍTULO III. METODOLOGÍA.....	34
3.1. Obtención del material vegetal. ....	34
3.2. Establecimiento de plantas de tabaco. ....	35
3.3. Multiplicación de plantas de tabaco en medio semisólido.....	35
3.4. Diseño del prototipo de sistema de inmersión temporal.....	35
3.5. Diseño del plan experimental para validación del prototipo...36	
3.6. Evaluación estadística de los resultados.....	38
4. CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	38
4.1. Construcción y funcionamiento mecánico y eléctrico del prototipo del SIT .....	38
4.2. Validación del prototipo. ....	40
4.3. Grado de oxidación.....	41
4.4. Número de hojas.....	43
4.5. Longitud de brote.....	48
4.6. Variable coeficiente de multiplicación. ....	50
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	52
5.1. Conclusiones.....	52
5.2. Recomendaciones .....	52
REFERENCIAS .....	54

## 1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Antecedentes

Los sistemas de inmersión temporal (SIT) son sistemas automatizados, diseñados para proveer condiciones de desarrollo óptimas, las cuales brindan un entorno adecuado para el desarrollo tanto de tejidos como de órganos vegetales. Las ventajas de la utilización de un SIT comparado con un sistema de propagación *in vitro* convencional son: una mejor disposición de nutrientes, debido a la utilización de medios líquidos; una oportuna transferencia de gases, mediante la renovación de la atmósfera del sistema; logrando con esto disminuir los trastornos fisiológicos y preservar la integridad morfológica de los explantes. El mecanismo que usan los SIT para este propósito es sumergir a los explantes en medio líquido en intervalos específicos, para luego pasar a una fase de desecación, donde los mismos permanecerán la mayor parte del tiempo (Georgiev *et al.*, 2014).

La operación simplificada del SIT (sea semiautomática o automática) facilita el uso para la investigación básica, “molecular farming”, producción de metabolitos, entre otros. Por esta razón, se han desarrollado variaciones de los SIT's que son empleados en la micropropagación de especies de interés comercial.

Uno de los modelos de SIT desarrollados con mayor relevancia en el mercado es el Recipiente de inmersión temporal automático (Récipient à Immersion Temporaire Automatique), más conocido por sus siglas en francés como RITA. Este ha sido utilizado repetidamente para cultivo de embriones somáticos. Su funcionamiento viene dado por un compresor de aire, el cual impulsa al medio situado en el inferior del RITA hacia la zona superior, donde se colocan los explantes a propagar (Alvard *et al.*, 1993) (Steingroewer *et al.*, 2013). El Biorreactor de Inmersión Temporal de Frascos Gemelos, es otro SIT comúnmente empleado en este campo. Consta de dos frascos separados, uno

de ellos actuará como cámara de cultivo y el otro como reservorio del medio líquido, para así transportar el medio de un frasco al otro, con la ayuda de un compresor de aire. Todos los SIT's anteriormente mencionados se han desarrollado con el objetivo de optimizar el cultivo *in vitro* (Escalona *et al.*, 1999; Welander *et al.*, 2014).

Otros ejemplares de los denominados SIT's es el "*Balloon-type Bubble Reactor*", o BTBR, el mismo que posee una columna que tiene como objetivo mantener las raíces sumergidas en el medio, en donde la mezcla líquida se transporta por un flujo ascendente de burbujas de aire, generadas por distribuidores de aire. Es así que, el momento en que las burbujas de aire suben, elevan la biomasa vegetal proporcionando el oxígeno requerido. Esta técnica es útil para estructuras organizadas (Ziv, 2005; Ducos *et al.*, 2008; Hand *et al.*, 2016).

Por otro lado, se han desarrollado SIT's con fines comerciales, con el objetivo de reducir costos de inversión y espacio. Siendo estos: el biorreactor RALM (Biorreactores RALM, Ralm Industria e Comércio Ltda., Brasil), el sistema SETIS (Vervit, Bélgica, distribuido por Duchefa Biochemie, Países Bajos), sistemas PLANTIMA (A-Tech Bioscientific Co., Ltd., Taiwán), PLANTFORM (Plant Form AB, Sweden y TC propagation Ltd., Irlanda) y WAVE (Sluis, 2008).

En los sistemas previamente mencionados se han empleado distintas especies vegetales para diversos estudios, entre ellas una de las más empleadas ha sido *Nicotiana tabacum* (tabaco), siendo ésta una especie herbácea, tiene su origen en el oeste de Sudamérica (González y Gurdián, 1998), proveniente del cruce de *Nicotiana sylvestris* y *Nicotiana tomentosiformis*, pertenecientes a la familia de las Solanáceas. Dichas especies diploides con series cromosómicas distintas dieron origen al híbrido alotetraploide *N. tabacum*.

Actualmente, es cultivada para uso comercial en todo el mundo, principalmente como componente del tabaco. A su vez, es empleada como materia prima para

la generación de productos farmacéuticos y de agricultura. Adicionalmente, posee gran relevancia en tanto para el mundo agrícola, como para el científico, ya que es uno de modelos más utilizados en diversos estudios sobre biotecnología vegetal (Shang *et al.*, 2014; Yuan *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2014). Cabe recalcar que *Nicotiana tabacum* se ha posicionado como un cultivo de importancia sustancial en la agricultura molecular, siendo altamente utilizada para la producción de proteínas recombinantes (biofactorías). Este posicionamiento de *N. tabacum* como uno de los principales biorreactores verdes se ha consolidado, dado que, por su metabolismo, es capaz de producir una amplia gama de: proteínas terapéuticas, anticuerpos, vacunas, moléculas inmunomoduladoras, entre otros (Xiao, 2015). Además, posee propiedades que la hacen resaltar ante el resto de cultivos. Por ejemplo, su corto tiempo de generación, su elevado contenido de proteínas, ser poco recalcitrante en cuanto al cultivo *in vitro* y su fácil transformación genética (Xiao, 2015; Tremblay, 2009). Es así que, que el tabaco ha sido empleado en numerosos estudios en el campo de la biotecnología vegetal. Como la respuesta de las plantas a patógenos (Wang *et al.*, 2014), estrés oxidativo (Colodete *et al.*, 2015), entre otros.

## 1.2. Planteamiento del problema

A pesar que el cultivo *in vitro* convencional ha sido utilizado ampliamente por mucho tiempo, con resultados positivos, está presentando algunas complicaciones importantes durante el proceso de propagación *in vitro*. Hoy en día, se ha logrado comprobar que el uso de gelificante en diferentes concentraciones en los medios para la propagación *in vitro* convencional, limita la difusión de nutrientes del medio de cultivo hacia el explante (Capote *et al.*, 2009) y aumenta la probabilidad de vitrificación en los explantes. La vitrificación se define como el trastorno morfológico y metabólico que sufre el material vegetal en los medios de cultivo con gelificante, debido a la presencia común de diversos factores del cultivo como factores nutricionales, baja intensidad luminosa, humedad relativa y la falta de renovación de la atmósfera. Las hojas

tienden a vitrificarse adoptando una apariencia vidriosa (Ziv, 1992; Gaspar *et al.*, 1992). Asimismo, existe el problema de necrosis, la cual se produce por la insuficiencia en cuanto a la transmisión de gases generada en el frasco de cultivo *in vitro* y la atmósfera exterior, la hiperhidricidad, entre otros (Fal *et al.*, 2002).

La intensa manipulación existente en la micropropagación por métodos convencionales, puede ser contraproducente para el material vegetal, ya que esto podría implicar una mayor pérdida de la biomasa, sea tanto por contaminación o manipulación de los explantes por parte del operador. Es por esta razón que para el desarrollo de métodos convencionales de propagación *in vitro* se necesita una gran cantidad de personal calificado (Welander *et al.*, 2014; Scherer *et al.*, 2013; Alvarenga *et al.*, 2015). Adicionalmente, las especies vegetales en medios convencionales suelen desarrollar dependencia hacia el medio de cultivo para sobrevivir. Por esta razón, la fase de aclimatación suele tornarse complicada, perdiendo así cantidad de material vegetal considerable en el proceso (Etienne *et al.*, 2002).

Los SIT's en su gran mayoría suelen verse implicados en elaborados sistemas conectivos (tubos, filtros, bombas, entre otros); tornándose compleja su manipulación y esterilización, además que estos no ocupan apropiadamente los espacios (Robert *et al.*, 2006; Basail *et al.*, 2013). Otro tema relevante implica los altos costos de adquisición en el Ecuador, ya que se deben asumir una serie de gastos que no necesariamente están relacionados con el proceso productivo, por lo que adquirir estos equipos para laboratorio con varias unidades, resulta altamente costoso.

### **1.3. Objetivo general.**

- Desarrollar un sistema de inmersión temporal utilizando *Nicotiana tabacum* como modelo experimental.

#### 1.4. Objetivo Específicos.

- Diseñar un sistema de inmersión temporal con capacidad de regulación del tiempo de inmersión según los requerimientos de la planta.
- Validar las condiciones de cultivo *in vitro* a partir de yemas de *Nicotiana tabacum* en el sistema de inmersión diseñado.

#### 1.5. Justificación de la investigación.

Los SIT's poseen un funcionamiento semi-automatizado como principal ventaja. Ésta se basa en el contacto del material vegetal con el líquido (medio de cultivo) por lapsos previamente programados, con el fin de evitar daños en el material vegetal, como la hiperhidricidad, vitrificación o estrés; a su vez brinda una adecuada aireación hacia los explantes en los procesos de micropropagación masiva (Cavallaro *et al.*, 2014; Teisson y Alvard, 1995; Akdemir *et al.*, 2014).

Es así que, los SIT's han sido desarrollados e implementados en varios procesos, con el fin de automatizar todos aquellos en los que interviene una manipulación excesiva por parte del operador. Además, por sus destacadas características permiten un escalado más controlado, sencillo y sin daño al material vegetal; reduciendo significativamente las pérdidas y los costos de producción. Ya que, los SIT's incrementan la producción empleando el mismo tiempo que la propagación convencional (Welandar *et al.*, 2014; Scherer *et al.*, 2013; Alvarenga *et al.*, 2015). Por ejemplo, en la publicación de Ross y Castillo (2010), "Micropropagación de *Achyrocline flaccida* (Weinm) en medios de cultivo líquidos", se incrementó de 4 a 11 brotes por yema, subiendo así la tasa de multiplicación en tan solo la mitad del tiempo establecido, sin la necesidad de realizar subcultivos, lo que conlleva, a la reducción de costos durante el proceso de micropropagación (Ross y Castillo, 2010). Asimismo, en un trabajo en el que utilizaron SIT's para propagar musáceas, se logró incrementar la tasa de multiplicación, de 2.6 a 3.5 veces en comparación a la tasa de multiplicación

obtenida en los cultivos convencionales *in vitro* en medio sólido (Colmenares *et al.*, 2003).

El diseño y desarrollo *de novo* de SIT's, es una alternativa viable que contribuiría a la solución de los problemas antes mencionados. Además, el desarrollo de nueva tecnología nacional contribuiría a independizar al país en cuanto a esta tecnología, aportando con el ahorro en cuanto a costos de adquisición y mantenimiento de equipos comerciales. Es así que, el sistema de inmersión temporal propuesto pretende solucionar una parte de este problema, desarrollando un sistema eficiente con aplicaciones prácticas para la generación de nuevos conocimientos.

## **2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. Sistemas de inmersión temporal**

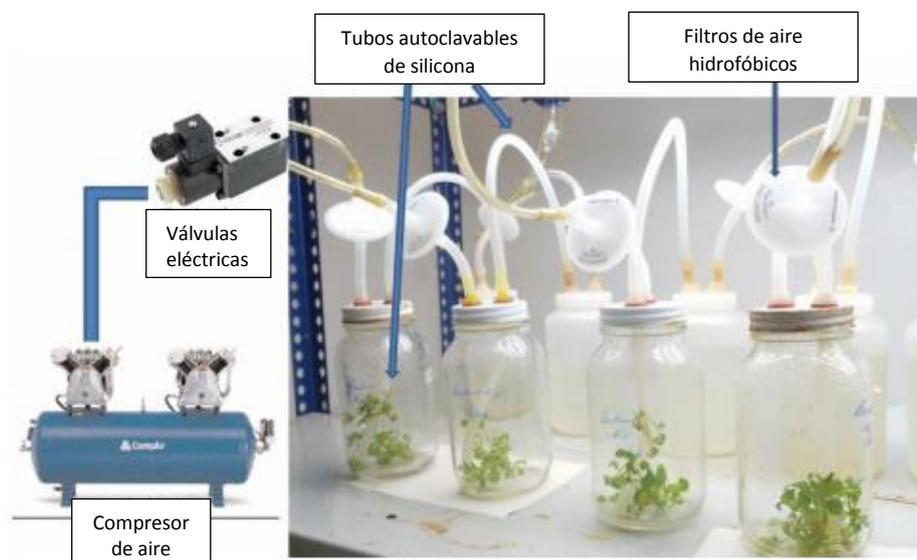
#### **2.1.1. Concepto**

Los sistemas de inmersión temporal (SIT) (Figura 2.1) son sistemas con funcionamiento semi-automatizado, utilizados para la propagación *in vitro*. Se basa en el contacto discontinuo del medio de los explantes con el medio de cultivo líquido, por intervalos de tiempo cortos, evitando la hiperhidricidad del material vegetal y posteriormente, se evita la acumulación de los gases tóxicos a través de un intercambio gaseoso dentro del sistema de cultivo (Jova *et al.*, 2005).

Estos sistemas tienen como principal función el cultivo *in vitro* de especies vegetales bajo condiciones controladas y principalmente bajo periodos de inmersión, fase en la cual los explantes se sumergen en el medio líquido absorbiendo los nutrientes (Alvard *et al.*, 1993) y la fase de desecación, en la cual los explantes están expuestos a la atmósfera gaseosa del recipiente de cultivo. Un SIT proporciona un ambiente más óptimo para el desarrollo del

material vegetal, debido a que se mantienen condiciones controladas y ambientes estériles, donde los explantes pueden desarrollarse adecuadamente, evitando contaminación por manipulación o por contacto con el ambiente externo. Además que, al presentar periodos de inmersión y desecación, está en constante renovación la atmósfera gaseosa. Adicionalmente, la fase de aclimatación se lleva a cabo con mayor facilidad (Georgiev, 2014; Etienne y Berthouly, 2005).

Estos equipos tecnológicos especializados llamados biorreactores, han sido diseñados para el cultivo masivo de células animales o vegetales, microalgas, explantes, entre otros (Georgiev, 2014).



*Figura 1.* Biorreactor de inmersión temporal.

Adaptado de (Mosqueda *et al.*, 2017).

### 2.1.2 Historia y desarrollo

La definición de sistemas de inmersión temporal (SIT) fue por primera vez descrita por Stewart *et al.* (1952), quienes observaron que, al cultivar zanahoria en medios líquidos, esta no tenía un crecimiento favorable, probablemente por la falta de oxígeno (Etienne y Berthouly, 2005). Posteriormente fue modificado por Stewart y Shantz (1956). En el año 1983 Harris y Mason consiguieron

sumergir a los explantes de diferente manera a lo previamente reportado, inclinando el recipiente hacia un extremo, para sumergir los explantes y hacia el otro extremo para que queden expuestos al aire del recipiente, con el fin de combinar los efectos positivos de los cultivos *in vitro* de aireación. A este sistema lo denominaron “*auxophyton*”. Por otro lado, en 1985, Tisserat y Vandercook diseñaron el primer SIT automático que tiene un funcionamiento de reflujo e inyección y no fue hasta 1993 que Alvard *et al.*, introducen el “*RITA*®”. A partir de aquí, el desarrollo de estos sistemas se volvió cada vez más frecuente. Es así que, en el año 1995 Teisson y Alvard empiezan a considerar la inmersión temporal como una útil herramienta para darle un giro completo al cultivo *in vitro* mediante el uso de medios líquidos (Hvoslef-Eide y Preil, 2005). Todos estos SIT respetan las siguientes condiciones (Etienne y Berthouly, 2005):

- Evitar la inmersión permanente
- Proveer de la transferencia de oxígeno adecuada
- Limitar los niveles de corte
- Habilitar cambios secuenciales de medios y automatización
- Disminuir la contaminación
- Reducir costos.

Existen alrededor del mundo múltiples sistemas de inmersión temporal, que han sido ampliamente utilizados para la micropropagación de especies vegetales. Se han desarrollado múltiples variaciones de SIT y son ampliamente utilizadas para el cultivo *in vitro* de especies de importancia comercial y económica. Estos sistemas han sido adaptados a la investigación del cultivo molecular, producción de metabolitos de plantas, micropropagación, entre otros, por su simple diseño y operación (Flores *et al.*, 2016). Algunos de los más importantes se describen a continuación.

### 2.1.3. “Recipiente de inmersión temporal automático” *RITA*<sup>®</sup>

Uno de los SIT's más conocidos y utilizados es el “Recipiente de inmersión temporal automático” (*Réceptier à Immersion Temporaire Automatique*), conocido comúnmente como *RITA*<sup>®</sup> (Figura 2.2). Este sistema automatizado fue por primera vez descrito en el año 1993 por Alvard *et al.* El sistema consiste en un frasco desmontable y un compresor de aire que tiene como función expulsarlo para impulsar el medio de cultivo desde la zona inferior del recipiente hasta la superior, con el fin de mojar los explantes que están situados en dicha zona (Alvard *et al.*, 1993; Steingroewer *et al.*, 2013).

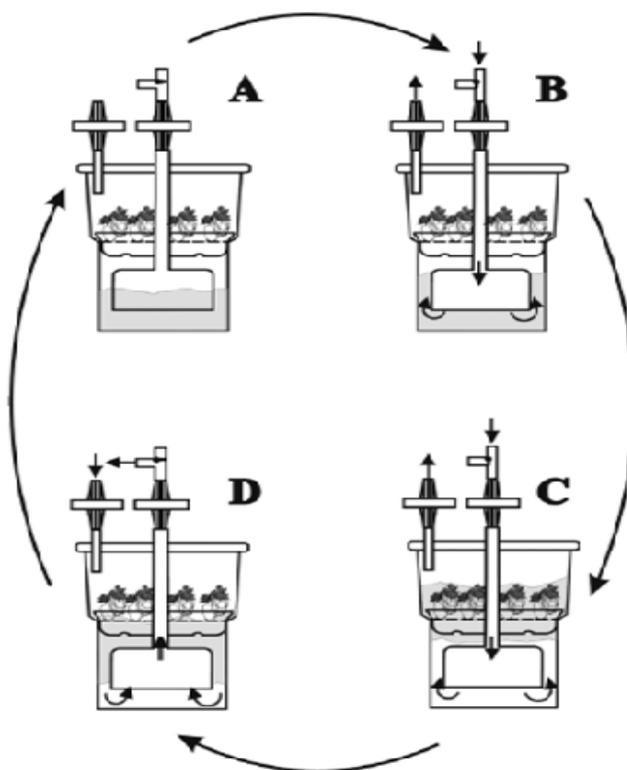


Figura 2. Sistema temporal “*RITA*<sup>®</sup>” y su funcionamiento.

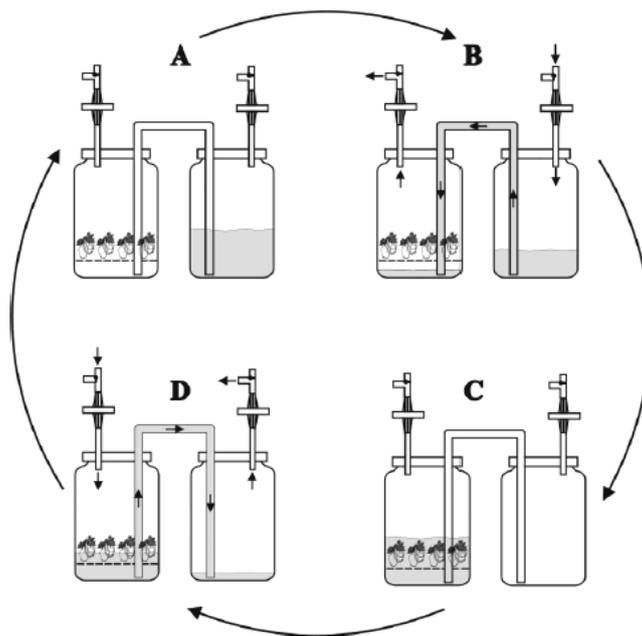
Tomado de (Gerogiev *et al.*, 2014).

- Periodo de desecación.
- Se aplica presión de aire a la parte inferior del recipiente y el medio líquido comienza a ascender.
- Periodo de inmersión.
- Se detiene el flujo de aire y el medio de cultivo comienza a descender por acción de la gravedad.

Este sistema ha sido muy utilizado en varias investigaciones, como es el caso del trabajo de McAlister *et al.* (2005), en el que utilizan un sistema de inmersión temporal *RITA*<sup>®</sup>, para la producción de clones de eucalipto (*Eucalyptus*). Se concluye que, con la utilización del *RITA*<sup>®</sup> la multiplicación incrementa, junto con el uso del número de brotes necesarios, así como con los mejores intervalos de exposición al medio (McAlister *et al.*, 2005). Por otro lado, en el estudio de Mordocco *et al.* (2009) utilizan un sistema de inmersión temporal *RITA*<sup>®</sup> para la producción masiva de híbridos interespecíficos de caña de azúcar (*Saccharum spp.*), donde se hizo una comparación entre un sistema denominado *SmartSett*<sup>®</sup> que es un sistema de regeneración de plantas de alta frecuencia y el sistema de inmersión temporal *RITA*<sup>®</sup>. Después de hacer las comparaciones, no se observaron diferencias significativas entre el crecimiento de las plantas con los distintos sistemas. Sin embargo, una diferencia importante fue el tiempo de crecimiento de las plantas, observándose que en el sistema *RITA*<sup>®</sup> hubo un crecimiento de la materia vegetal en menos tiempo que en el *SmartSett*<sup>®</sup> (Mordocco *et al.*, 2009).

#### **2.1.4. Biorreactor de inmersión temporal de frascos gemelos: “BIT Cubano”**

El Biorreactor de Inmersión Temporal de Frascos Gemelos, más conocido como “BIT cubano” (Figura 2.3). Fue por primera vez descrito en 1999 por Escalona *et al.* Se caracteriza por el uso de una bomba de aire que tiene como única función transportar el medio de cultivo, desde un frasco denominado reservorio, hacia otro donde se encuentran los tejidos vegetales, denominado cámara de cultivo. Allí, por periodos de desecación y de inmersión, los explantes se desarrollarán (Escalona *et al.*, 1999; Welander *et al.*, 2014).



*Figura 3.* Sistema de inmersión temporal BIT Cubano o “Twin Flasks” y su funcionamiento:

Tomado de (Gerogiev *et al.*, 2014).

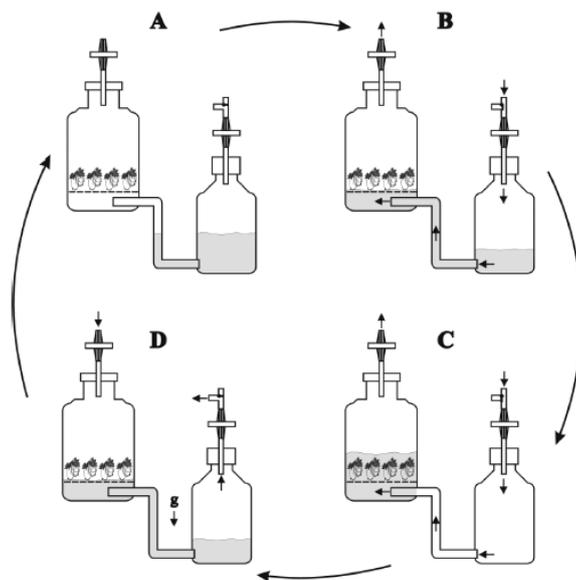
- Periodo de desecación, el medio de cultivo se encuentra en el tanque de almacenamiento.
- Se aplica presión de aire al tanque de almacenamiento y el medio de cultivo líquido comienza a migrar al tanque de cultivo.
- Periodo de inmersión.
- Se aplica nuevamente presión de aire, esta vez en el tanque de cultivo y el medio migra nuevamente al tanque de almacenamiento.

El sistema de vasos gemelos ha sido ampliamente utilizado en todo el mundo por su sencilla replicación y manipulación. El primer estudio realizado en vasos gemelos fue en el Centro de Bioplasmas de Cuba, de ahí proviene el nombre de “BIT cubano”, donde se utilizó el sistema de vasos gemelos para la multiplicación de brotes de piña (*Ananas comosus* L. Merr). En dicho estudio se pudo concluir que, los explantes que fueron cultivados en el SIT tuvieron una tasa de multiplicación más alta que los cultivados con métodos convencionales, obteniendo valores de entre el 300% y 400% comparado con los métodos convencionales (González, 2005; Escalona *et al.*, 1999). Por otro lado, Mosqueda *et al.* (2017) en su estudio para la propagación de Gerbera (*Gerbera jamesonii*) utiliza un sistema de inmersión temporal de frascos gemelos, con

ventilación para evitar la hiperhidricidad de los explantes, lo cual fue útil ya que se hizo una comparación entre el SIT con ventilación y el que no tenía ventilación, llegando a la conclusión que, en un SIT con ventilación, el crecimiento de las plantas es mejor y además se evita la hiperhidricidad (Mosqueda *et al.*, 2017).

#### **2.1.5. Sistema de inmersión temporal: “*Ebb-and-Flow*®”**

El sistema “*Ebb-and-Flow*®” es una modificación del Sistema de Inmersión Temporal de Frascos Gemelos. El sistema posee: dos recipientes, uno con boca ancha que funciona como frasco de cultivo y uno de menor tamaño que funciona como frasco de almacenamiento y va colocado debajo del frasco de cultivo, ambos están conectados entre sí por tubos externos que van adaptados en el fondo de cada tanque (Figura 2.4). El material vegetal va sobre un soporte de poliuretano, que tiene como función mantener la humedad necesaria que va desde el 85% al 90% durante la fase de desecación y mientras ocurre la fase de inmersión funciona como un rociador de aire. Este sistema tiene como ventajas la simple construcción, una automatización sencilla y el poco gasto de energía. Por otro lado, posee ciertas desventajas, siendo la principal la no uniformidad en la distribución de luz en el interior del frasco de cultivo (Georgiev *et al.*, 2014).



**Figura 4.** Sistema de inmersión temporal “Ebb-and-Flow<sup>®</sup>” y su funcionamiento: Tomado de Georgiev *et al.*, 2014.

- Fase de desecación.
- Migración del medio de cultivo hacia el frasco de cultivo, a través de presión de aire aplicada en el frasco de almacenamiento del medio líquido.
- Fase de inmersión.
- Drenado del medio líquido por acción de la gravedad.

Se han reportado algunas investigaciones de cultivo *in vitro* de plantas utilizando el sistema de inmersión temporal “Ebb-and-Flow<sup>®</sup>”. Uno de ellos es el que se llevó a cabo por James y Iersel (2001) para la producción de petunias (*Petunia × atkinsiana*) y begonias (*Begonia multistaminea*) con distintas concentraciones de fósforo en el medio de cultivo. El estudio resultó exitoso con el uso de este SIT y lograron resultados favorables, concluyendo que la utilización de distintos medios de cultivo tuvo muy bajo efecto sobre el crecimiento del material vegetal o el contenido de nutrientes en los tejidos. Con lo que se infiere que estas especies de plantas pueden ser cultivadas en distintos medios sin dificultad (James y Iersel, 2001).

### 2.1.6. Sistema de inmersión temporal: “*Thermo-Photo-Biorreactor*®”

El “*Thermo-Photo-Biorreactor*®” (Figura 2.5) fue desarrollado por Zuñiga *et al.* (2013), con el único fin de micropropagar y producir metabolitos secundarios con propiedades antioxidantes de pasto antártico (*Deschampsia antártica*), útiles para la salud humana. El presente sistema combina dos conceptos que incluyen la multiplicación y el mantenimiento de la biomasa del pasto antártico, la inducción y explotación de todas sus propiedades como una muy buena fuente de principios activos naturales. Los compuestos fotoprotectores y antioxidantes sintetizados por el pasto antártico, proyectaron un desafío técnico para desarrollar sistemas que permitan aumentar las concentraciones de estos compuestos, usando condiciones controladas y óptimas para la especie vegetal. La *D. antártica* es una especie antártica que resiste a las heladas. Zuñiga *et al.* (2013) plantean que, convencionalmente con medios sólidos solo se logra estimular la multiplicación de la especie vegetal luego de los 15 días. Por otro lado, comprobaron que con el uso del presente SIT se logró duplicar la masa vegetal en 14 días. El sistema fue por primera vez publicado en el año 2013 (Zuñiga *et al.*, 2013). Dicho SIT está conformado por dos recipientes de vidrio que se encuentran interconectados por tubos de acero inoxidable. El recipiente superior funciona como recipiente de cultivo. El sistema posee una camisa de agua que controla la temperatura y tiene una fuente de luz UV que se encuentra adherida a la tapa superior. El material vegetal se coloca en una base de acero inoxidable que se encuentra dentro del recipiente de cultivo. Por otro lado, está el recipiente inferior que funciona como frasco de almacenamiento del medio líquido, el cual posee dos puertos externos: uno en la parte superior que tiene como función el suministro de aire y el otro colocado en la parte inferior, que sirve para tomar muestras y cargar medio líquido. Una de las mayores ventajas de éste sistema es la facilidad de controlar la radiación UV y la temperatura, lo cual es bastante útil para plantas extremófilas. Y una de sus mayores desventajas es su compleja y costosa estructura (Georgiev *et al.*, 2014).

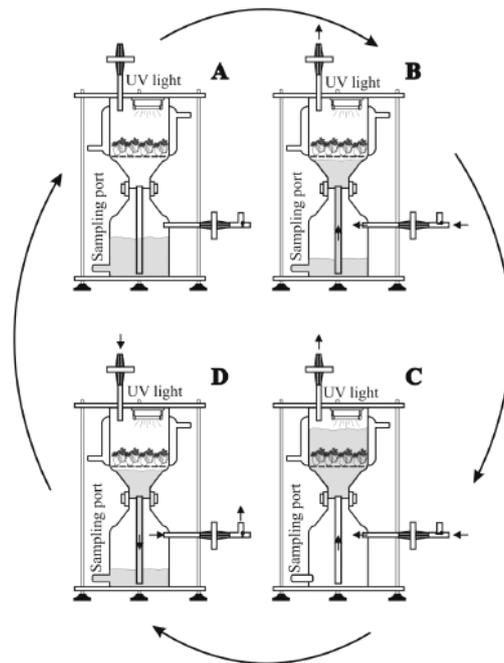


Figura 5. Sistema de inmersión temporal “Thermo-Photo-Biorreactor®” y funcionamiento.

Tomado de (Georgiev *et al.*, 2014).

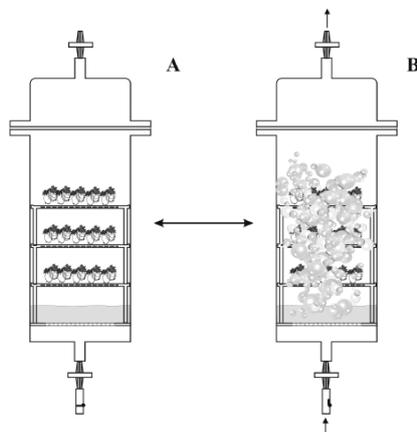
- a. Fase de desecación.
- b. Migración del medio de cultivo del recipiente de almacenamiento al de cultivo, a través del aire suministrado al recipiente de almacenamiento.
- c. Periodo de inmersión.
- d. El medio de cultivo líquido desciende al recipiente de almacenamiento por acción de la gravedad.

### 2.1.7. Sistema de inmersión por burbujas (BIB)

El sistema de inmersión por burbujas BIB (*Biorreactor de Imersão por Bolhas*) usa un novedoso método de cultivo, el mismo que se basa en la inmersión temporal del material vegetal en espuma, en lugar de en medio de cultivo líquido. Este SIT está conformado por un cilindro de vidrio, el cual está dividido por una placa micro-porosa, en dos compartimentos transversales (Figura 2.6). El compartimento superior funciona como cámara de cultivo, donde unas placas internas de acero inoxidable soportan a los explantes y se añade medio de cultivo con detergente *Tween 20* al fondo de este compartimento. Por otro lado, el compartimento inferior tiene como función la distribución de aire a

través de la placa micro-porosa. Se ha visto que una limitación de éste sistema es justamente el uso de detergente, ya que se han realizado varias investigaciones con el uso de este sistema de inmersión. En una de ellas se ha logrado demostrar una mejora en crecimiento frente al sistema *RITA*, en cuanto a número de brotes y a crecimiento de explantes de algunas especies (Georgiev *et al.*, 2014). Uno de estos estudios es el de Newton *et al.* (2011), en el cual evalúan el crecimiento del árbol del té (*Melaleuca alternifolia*), donde se evidenció que en el *BIB*<sup>®</sup> se obtuvieron mejores resultados de masa fresca total y de brotes, en comparación con el sistema *RITA*<sup>®</sup>, y los investigadores concluyeron que esto pudo deberse al mayor espacio de almacenamiento del *BIB*<sup>®</sup>, ya que esto puede permitir que la concentración de CO<sub>2</sub> sea mayor dentro del recipiente, el cual puede ser utilizado en la fotosíntesis de la planta y se promueve por ende una mayor acumulación de masa seca (Newton *et al.*, 2011).

Sin embargo, la presencia de detergente en el medio nutriente, así como el tiempo prolongado para el drenaje del líquido pueden restringir la aplicación de *BIB* para la propagación de algunas especies de plantas sensibles.



*Figura 6.* Biorreactor de inmersión por burbujas y su funcionamiento

Tomado de (Georgiev *et al.*, 2014).

- a. Fase de desecación.
- b. Fase de inmersión, en la cual se produce un suministro de aire y se da la formación de espuma, los explantes son sumergidos en el medio burbujeante y al detenerse el suministro de aire se reduce la espuma conforme avanza el tiempo, gracias a un drenaje del líquido y los explantes quedan expuestos a la fase gaseosa.

Una variación de este sistema, ampliamente utilizada es el *Balloon-type Bubble Reactor*, más conocido como *BTBR*. Es un sistema utilizado para el cultivo de estructuras ya organizadas (raíces fasciculadas, bulbos, tubérculos, brotes, entre otros) que logra mantener las raíces de las plantas sumergidas en el medio de cultivo, gracias a una columna que forma parte de su estructura. Su funcionamiento depende de la generación de un flujo de burbujas de aire ascendente; a medida que esto sucede y las burbujas se elevan, elevan consigo al material vegetal y suministran a su vez el oxígeno necesario (Ziv, 2005; Ducos *et al.*, 2009; Hand *et al.*, 2016).

### **2.1.8. Biorreactores desechables**

Últimamente, se han venido desarrollando algunos sistemas de inmersión temporal con el fin de reducir espacio, disminuir costos de inversión en cuanto a equipos e incluso la mano de obra. Algunos de estos son: biorreactor *Wave and Undertow*, conocido por sus siglas como WU. Este sistema usa contenedores para cultivo desechables, los cuales se llenan con medio de cultivo líquido y son inflados con aire. Además, consta de una plataforma móvil de balanceo, la cual provoca un movimiento intermitente ascendente y uno descendente, generando una continua aireación. Otro de los sistemas se denomina biorreactor RALM (Biorreactores RALM, Ralm Industria e Comércio Ltda., Brasil), el cual funciona bajo los mismos principios del BIT cubano (frascos gemelos). Por otro lado, está el SETIS (Vervit, Bélgica, distribuido por Duchefa Biochemie, Países Bajos) que tiene un funcionamiento similar al *Ebb-and-Flow*. Están también los SIT PLANTIMA (A-Tech Bioscientific Co., Ltd., Taiwán) y PLANTFORM (Plant Form AB, Sweden y TC propagation Ltd., Irlanda), que se basan en el mismo funcionamiento del RITA. Así como el *Box-in-Bag* que es un SIT desechable, evidentemente un ejemplo de innovaciones y tecnologías prometedoras (Loyola *et al.*, 2016; Ziv, 2005; Ducos *et al.*, 2009).

### 2.1.9. Condiciones de operación de un SIT

En los biorreactores de inmersión temporal, las condiciones de operación son cruciales para su correcto funcionamiento. A través de la regulación de factores físicos y/o a su vez nutricionales, como: la temperatura, luz, humedad relativa, tiempos de inmersión y frecuencia, fotoperíodo, entre otros; se consigue un óptimo funcionamiento de los SITs. Por lo general, los biorreactores constan mínimo de un recipiente de cultivo y una parte automatizada (Georgiev, 2014).

Los factores críticos en la eficiencia de un SIT son el tiempo y la frecuencia de inmersión, debido a que estos nos permiten controlar la hiperhidricidad, evitando de esta forma la muerte del material vegetal por esta causa, además que nos ayudan a establecer la absorción de nutrientes por los explantes (Berthouly y Etienne, 2005; Santos *et al.*, 2011). Además, según Escalona (1999) y Berthouly y Etienne (2005) los tiempos de inmersión deben variar según la fase de cultivo en la que se encuentre el explante. El tiempo y la frecuencia de inmersión van a variar según las necesidades de cada planta. Por ejemplo, en el estudio de Santos *et al.* (2011) para la multiplicación en sistema de inmersión temporal del clon de malanga (*Xanthosoma spp.*), determinaron que el tiempo más óptimo que favoreció al coeficiente de multiplicación del material vegetal (brotes de yemas axilares) fue de 14 min, en comparación con los demás que fueron probados, ya que se evidenció que en este tiempo hubo una disponibilidad de nutrientes mayor. Por otro lado, en cuanto a la frecuencia de inmersión se evidenció que cada 4 h se observaron los mejores resultados, el cual tuvo diferencias significativas en comparación con los demás tratamientos, presentando los mejores resultados en la multiplicación de los explantes, utilizando un sistema de inmersión de vasos gemelos (Santos *et al.*, 2011).

Por otro lado, se ha observado que el volumen del medio líquido es un factor importante en el cultivo *in vitro* en SIT's, el cual dependerá del sistema y la especie vegetal que se este utilizando. Es así que, en un estudio sobre la

multiplicación de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) en el SIT BIT cubano o “Twin Flask” se determinó que el volumen óptimo por explante es 40 mL y en el SIT RITA es 50 mL, volúmenes con los cuales se consiguieron mejores resultados en cada SIT. Asimismo, Escalona (1999) determinó que para piña (*Ananas comosus*) el volumen adecuado es de 200 mL de medio líquido y que al sobrepasar este volumen se limita el coeficiente de multiplicación (Santos *et al.*, 2011; Lorenzo *et al.*, 1998; Escalona *et al.*, 1999).

### **2.1.10. Factores que afectan el crecimiento de plantas en un SIT**

Así como existe una gran variedad de SITs, existen también varios factores que pueden afectar el crecimiento de los explantes en la operación de un SIT. A continuación se detallarán algunos de ellos.

#### **2.1.10.1. Velocidad de cizalla**

Los medios líquidos de los SIT's requieren mezclas adecuadas para la correcta transferencia efectiva, tanto de nutrientes como de oxígeno logrando así una homogeneidad de la suspensión. Es así que, la mezcla se da mediante burbujeo en reactores de levantamiento aéreo. Para esto, se requiere tensiones de cizalladura hidrodinámicas para lograr una mezcla adecuada, asociada con gradientes de velocidad dentro del líquido agitado o burbujeado. Sin embargo, numerosos estudios que involucran cultivos de células microbianas, de mamíferos y de plantas, han demostrado que la cizalladura hidrodinámica puede afectar negativamente el crecimiento, el metabolismo y la formación de productos. Igualmente, las células vegetales son particularmente sensibles al daño por cizalla debido a su tamaño relativamente grande, en comparación con los microorganismos, la pared celular rígida y las vacuolas grandes (Ratkovich *et al.*, 2015).

Por lo tanto, es importante caracterizar el entorno en cuanto a la velocidad de cizallamiento de los sistemas de cultivo para el crecimiento de biomasa vegetal, para reducir el daño celular y la pérdida de rendimiento del producto debido a la

hidrodinámica. La mezcla puede no ser muy importante en un SIT ya que el contacto entre la biomasa y el medio líquido es periódico y la transferencia de nutrientes ocurre a través de una película fina de medio en la superficie de los tejidos entre inmersiones. Sin embargo, la cizalladura hidrodinámica durante la inmersión periódica puede afectar las respuestas biológicas.

Es así que, Barreto *et al.* (2017) comprobó que si existe sensibilidad a la cizalla en cuanto a la regeneración de brotes *in vitro* del callo de *N. tabacum* por inmersión periódica en medios líquidos en un biorreactor, observándose reducciones significativas tanto en crecimiento, como actividad metabólica a una velocidad de cizallamiento de  $96.7 \text{ s}^{-1}$ , que corresponde a una disipación de energía crítica durante los 20 días iniciales en un SIT, disminuyendo exponencialmente la expresión de la proteína analizada, al aumentar la cizalladura, incluso a tasas moderadas de aireación (Barreto *et al.*, 2017).

#### **2.1.10.2. Temperatura**

La temperatura por otro lado, es un factor importante en lo que respecta al metabolismo de los explantes en el cultivo *in vitro* (Palomares *et al.*, 2003). Según varios estudios un rango óptimo de temperatura para el crecimiento de los explantes oscila entre los 20°C a los 28°C, sin embargo, la temperatura va a diferir entre las distintas especies, edad y genotipo (Pierik, 1990). Por ejemplo, en el estudio de Basail *et al.* (2011), para la micropropagación en SIT de plátano (*Musa x paradisiaca*) usaron una temperatura de  $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Por otro lado, en la investigación de Lorenzo *et al.* (1998) para la micropropagación en SIT de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) usaron una temperatura de  $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### **2.1.10.3. Intensidad de luz y fotoperiodo**

Por otro lado, un factor clave es también la intensidad de luz y el fotoperiodo que necesita cada especie vegetal. Es importante mencionar que los dos factores tienen una gran influencia sobre las características morfológicas de las

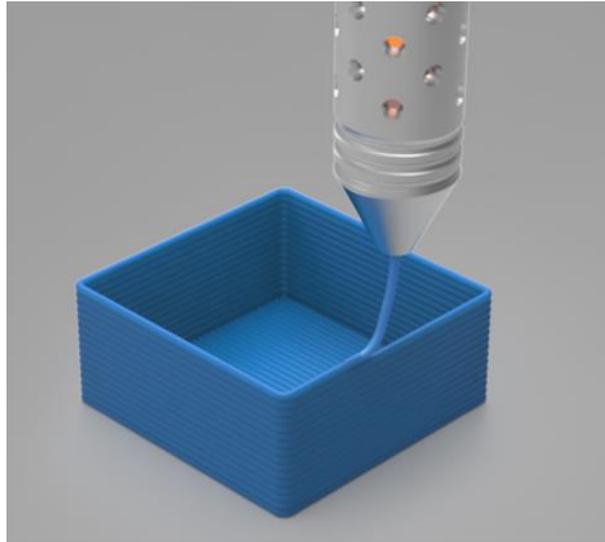
plantas. La intensidad de la luz debe oscilar entre 8 a 15 Wm<sup>2</sup>. Una planta que se desarrolla en condiciones controladas al crecer en un medio con sacarosa, necesita menos luz que las que se desarrollan tradicionalmente en campo, ya que esta facilita el metabolismo de las autótrofas. Por lo general, el fotoperiodo utilizado en cultivo *in vitro* son de 14-16 h de exposición a la luz (Pierik, 1990). Por ejemplo, en el estudio de Basail *et al.* (2011), para la micropropagación en SIT de plátano (*Musa x paradisiaca*) usaron un fotoperiodo de 16 h de luz. Por otro lado, en la investigación de Lorenzo *et al.* (1998) para la micropropagación en SIT de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) usaron un fotoperiodo de 8 h de luz.

## **2.2. Impresión 3D**

Se ha visto que, actualmente las impresiones 3D están siendo empleadas en el campo biológico para la impresión de prototipos. Por lo que se considera una técnica útil para aplicar en el campo de la biotecnología vegetal, en cuanto a la creación de nuevos sistemas de inmersión temporal que sean totalmente reproducibles, ya que integrarían piezas diseñadas e impresas con materiales resistentes y de fácil esterilización. También llamada manufactura aditiva, no es más que un conjunto de tecnologías de fabricación, que tienen de base o molde un modelo digital permitiendo construir *de novo*, de manera automática, diferentes estructuras, agregándolas capa a capa de manera precisa, elaborando así un objeto de tres dimensiones (Vicente, 2018).

### **2.2.1. Modelado por deposición fundida (FDM)**

Su funcionamiento se basa en la colocación de un polímero estratégicamente, capa a capa, el cual es previamente fundido y desciende por gravedad en una base plana (Figura 2.7). Es así que, el material se encuentra inicialmente en estado sólido, almacenado en forma de rollos; posteriormente este se funde, siendo expulsado en hilos milimétricos, que al caer se van solidificando y tomando la forma deseada (Barahona *et al.*, 2012).



*Figura 7.* Proceso de Modelado por deposición fundida (FDM).  
Tomado de (Pérez *et al.*, 2015).

### **2.2.2. Prototipado rápido**

El prototipado rápido representa una evolución en cuanto a la creación de prototipos. Ya que este es un paso importante en cuanto al ahorro de tiempo, especialmente cuando se habla de modelos complicados. Es comúnmente empleado para la creación de partes o componentes individuales, ya que su creación suele ser compleja, además que el tiempo requerido para esto es tan solo tres semanas para piezas complicadas. Desde 1988 han surgido más de veinte técnicas diferentes de prototipado rápido (Ludmila *et al.*, 2012).

La fabricación aditiva del prototipado rápido requiere del diseño virtual asistido por computadora (CAD), transformando la materia prima en secciones transversales delgadas y horizontales, creando capas sucesivas hasta completar el modelo (Figura 2.8). La principal ventaja de la fabricación aditiva es su capacidad de crear casi cualquier forma o característica geométrica (Novakova *et al.*, 2012).

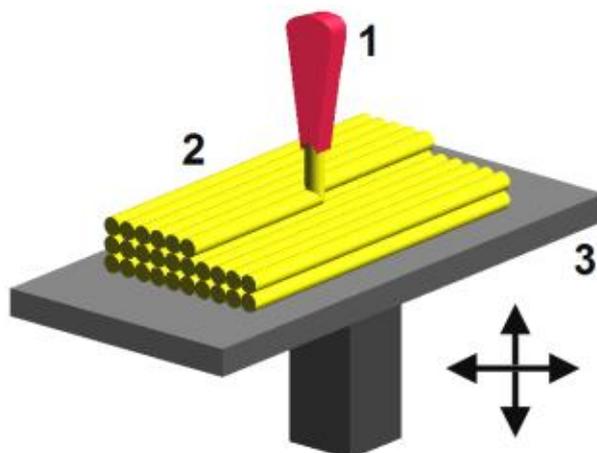


Figura 8. Fabricación aditiva del prototipado rápido.

Tomado de (Novakova, 2012).

### 2.2.3. Materiales comunes utilizados en FDM

El Modelado de Deposición Fundida es uno de los procesos comúnmente empleados para el prototipado rápido, ya que brindan prototipos totalmente funcionales de plástico ABS. El producto final de FDM es de plástico de alta calidad “Acrilonitrilo Butadieno Estireno” (ABS), el mismo que es usado en ingeniería de uso común, permitiendo realizar pruebas funcionales en piezas de muestra (Novakova *et al.*, 2012).

### 2.2.4. Termoplástico

Un termoplástico es una clase de plástico que está fabricado con polímero. Este es un líquido homogéneo que al momento de ser sometido a temperaturas relativamente altas y al descender la temperatura, se vuelve rígido en un estado de transición vítrea.

Los poliésteres termoplásticos son empleados frecuentemente en la industria eléctrica y electrónica con el fin de aislar piezas, teniendo una función similar a los *nylons* alifáticos. Los poli *1,4*-butilen tereftalatos (*poly 1,4-butylene terephthalate*) o PBTs tienen buena estabilidad dimensional, así como resistencia térmica. La rigidez y la resistencia del PBT reforzado, permite que

sea usado en secciones de pared. Se ha visto que tiene la capacidad de permanecer con la misma forma en ambientes de temperatura elevada, teniendo en cuenta que se ha hecho estas pruebas con temperaturas relativamente altas de deflexión de calor (Levchik, 2005). Un ejemplo claro de esta resistencia térmica, se ha dado cuando los materiales resisten la exposición de baños de soldadura en el montaje de circuitos electrónicos.

Hablando de materiales termoplásticos en general. Estos permiten empelar un polímero adecuado para casi todas las aplicaciones. Es así que existen polímeros estables a temperaturas tales como 250 °C, como por ejemplo, polieteretercetona (PEEK) y otros que son aún más resistentes, por ejemplo, a productos químicos como soluciones alcalinas, ácidos y disolventes. Estos termoplásticos pueden ser: perfluoralcoxi (PFA). Por otro lado, las microestructuras moldeadas pueden ser fabricadas blandas y elásticas, con materiales como polioximetileno (POM) o duras y frágiles, empleando polisulfona (PSU). También existen materiales ópticamente translucidos, siendo estos el copolímero de cicloolefina COC y opacos la poliamida (Levchik, 2005).

Las piezas como producto de FDM realizadas en ABS son lo suficientemente resistentes al calor, productos químicos y a la humedad, permitiendo así que dichas piezas se utilicen en pruebas funcionales tanto experimentales como aplicadas, según el uso final que tengan las mismas.

FDM permite fabricar piezas reales, resistentes para prototipos, pruebas funcionales, instalación y para su uso final. Los termoplásticos de producción real son estables y no tienen alabeos, contracciones ni absorción de humedad apreciables, como las resinas (y polvos) en procesos competitivos. Debido a que los termoplásticos son ambientalmente estables, la precisión (o tolerancia) de la parte no cambia con las condiciones ambientales o el tiempo. Esto permite que las piezas FDM se encuentren entre las más dimensionalmente precisas. Es así que los termoplásticos más óptimos para la creación y fabricación de piezas de SITs, debene cumplir ciertos parámetros como lo es:

la termoresistencia, ya que las piezas creadas en 3D serán sometidas a temperaturas mayores a 150 °C para ser esterilizadas, así como resistencia a la fricción debido al movimiento constante generado; biocompatibilidad, para evitar daño sobre especies vegetales empleadas en SIT's. De preferencia, ciertas piezas del SIT deben ser translúcidas para mejorar el ingreso de luz al SIT. Todos estos termoplásticos se muestran a continuación en la tabla 1 (Novakova *et al.*, 2012).

Tabla 1.

*Termoplásticos más óptimos para la creación y fabricación de piezas de un SITs.*

Termoplástico	Características
Termoplástico ABS-M30i (acrilonitrilo butadieno estireno)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Material biocompatible (certificado ISO 10993)</li> <li>• Material ideal para medicamentos, productos farmacéuticos, alimentos e. industrias de envasado</li> <li>• Esterilizable con radiación gamma u óxido de etileno</li> <li>• (EtO) métodos de esterilización.</li> </ul>
Termoplástico ABSi	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Material translúcido</li> <li>• Ideal para aplicaciones de lentes de cola automotrices</li> <li>• Buena combinación de propiedades mecánicas y estéticas.</li> </ul>
PC-ABS termoplástico (policarbonato acrilonitrilo butadieno estireno):	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Las propiedades más deseables de los materiales de PC y ABS</li> <li>• Propiedades mecánicas superiores y resistencia al calor de PC</li> <li>• Excelente definición de características.</li> </ul>
PC termoplástico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Termoplástico industrial más ampliamente</li> </ul>

(policarbonato):	<p>utilizado</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Preciso, duradero y estable para piezas fuertes</li> <li>• Propiedades mecánicas superiores y resistente al calor</li> <li>• Alta resistencia a la tracción y puede manejar altas temperaturas.</li> </ul>
Termoplástico PC-ISO	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Material biocompatible (certificado ISO 10993),</li> <li>• Material ideal para medicamentos, productos farmacéuticos y alimentos industrias de envasado</li> <li>• Esterilizable con radiación gamma u óxido de etileno (EtO).</li> </ul>
termoplástico PPSF / PPSU (polifenilsulfona)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mayor resistencia al calor y a los productos químicos de todos los FDM materiales.</li> <li>• Material mecánicamente superior, mayor resistencia</li> <li>• Esterilizable a través de autoclave de vapor, EtO, plasma, químico</li> <li>• Esterilización por radiación</li> <li>• Ideal para aplicaciones en entornos cáusticos y de alta temperatura.</li> </ul>

Tomado de (Rodríguez, 2018; Jurecková *et al.*, 2016; López *et al.*, 2018)

### 2.2.5. Impresiones 3D como herramientas para el desarrollo de prototipos biológicos.

Las impresiones 3D y el prototipado rápido no han sido guiadas únicamente a la elaboración y creación de prototipos industriales, esta herramienta también ha sido empleada con el fin de usarse para crear prototipos o herramientas en

el campo biológico e ingeniería vegetal. Tal es el caso de un estudio, en el cual se reportó la creación de herramientas mediante impresiones 3D de código abierto con un costo de fabricación relativamente bajo, reduciendo costos al permitir la fabricación distribuida de sustitutos para equipos especializados y productos convencionales fabricados en masa, que facilitarían el trabajo del agricultor. Varios de estos equipos se muestran a continuación (Pearce, 2015).

#### **2.2.5.1. Herramientas manuales**

Existen varias herramientas útiles para agricultores, poniendo en contexto un ejemplo claro, es el selector de manzanas de tres garras (Figura 2.9 A) esta herramienta reduce la mano de obra en cuanto la recolección de manzanas. Todas las piezas con lo que se ensambla esta herramienta de mano fueron creadas digitalmente e impresas individualmente ensamblando los componentes (Pearce, 2015).

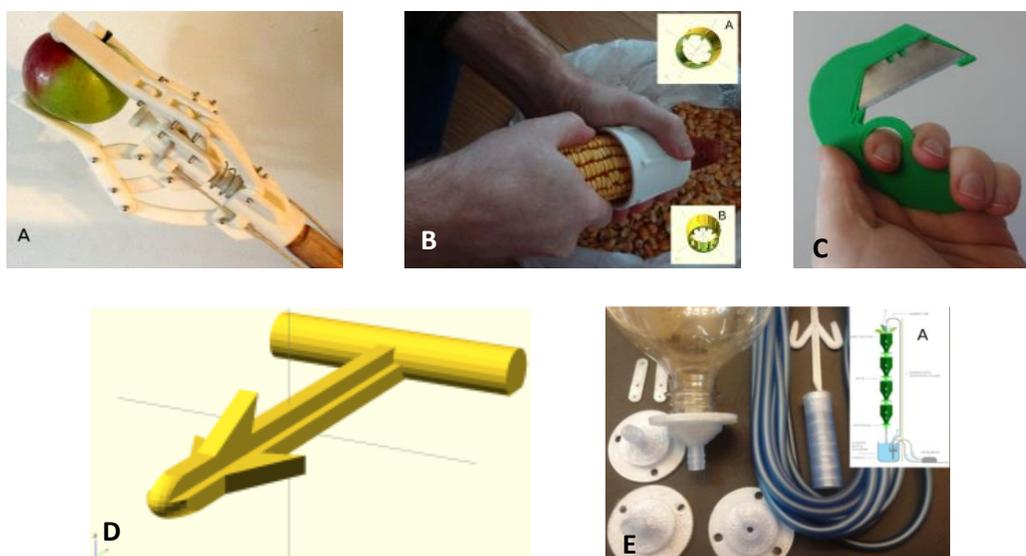
A su vez, no solo se han creado piezas compuestas de varias piezas, también se creó una sola pieza única (Figura 2.9 B), la cual tiene como función desgranar el maíz con facilidad, ayudando de gran manera ya que se evita el contacto directo con los granos del maíz, previniendo contaminación, a su vez que se agilizará el proceso de desgranado artesanal de maíz (Pearce, 2015).

Por otro lado, animales criados en una granja orgánica, necesitan ser despellejados para obtener carne intacta de alta calidad. Para agilizar esto, se logró imprimir una herramienta de mano la cual posee una hoja de cuchilla reemplazable y económica (Figura 2.9 C). Permittedle al agricultor cortar solo lo que se necesita de manera segura, garantizando la facilidad de uso y reduciendo así los costos (Pearce, 2015).

Otro ejemplo claro para esta aplicación es una herramienta empleada en el momento de destripar a un animal (Figura 2.9 D). Esta herramienta puede ser personalizable, logrando dimensionar la herramienta adecuadamente para cada animal que se está siendo procesado. Eliminando así la necesidad de

cortar el área con un cuchillo, haciendo que el proceso de preparación en el campo sea más rápido, más seguro y más fácil.

Finalmente existen sistemas hidropónicos (Figura 2.9 E) los cuales permiten dar solución de nutrientes, control de patógenos biológicos, recirculación. Sorprendentemente, un estudio realizado por Atkin y Nichols encontró que la hidroponía orgánica es un sistema de producción de cultivos más sostenible que los sistemas orgánicos clásicos basados en el suelo. Los beneficios ambientales de la agricultura orgánica y los sistemas alimentarios están bien establecidos, contribuyendo a la mitigación del cambio climático, debido a la mejora de la eficiencia energética y la conservación de la biodiversidad. Para mejorar aún más los beneficios ambientales de la hidroponía orgánica, se puede utilizar la fabricación distribuida con impresoras 3D de código abierto, ya que existe evidencia de que tiene impacto ambiental menor que la fabricación convencional.



*Figura 9. Herramientas impresas en 3D.*

Tomado de (Pearce, 2015).

- Selector de manzanas de tres garras.
- Proceso para desgranar maíz.
- Herramienta de mano para desollar animales de consumo humano.
- Herramienta empleada para desentrañar un animal de consumo humano.
- Componentes de equipo de hidroponía impresos en 3D.

## **2.3. *Nicotiana tabacum***

*Nicotiana spp.* actualmente es uno de los cultivos comerciales más importantes cultivado en todo el mundo, perteneciente a la familia Solanaceae con más de 64 especies. Se ha demostrado que *N. tabacum* es anfidiplóide natural ( $2n = 4x = 48$ ), surgido por hibridación las especies silvestres *N. sylvestris* y *N. tomentosiformis* (Darvishzadeh; 2013).

### **2.3.1. Descripción botánica**

#### **2.3.1.1. Tallo**

Tiene un tallo es erecto, redondo, veloso y viscoso con ramificación cerca de la parte superior de 1 a 2 metros promedio (Figura 2.10 A) (González y Gurdíán, 1998).

#### **2.3.1.2. Hojas**

Posee numerosas hojas grandes (Figura 2.10 B), alternas, sésiles, decurrentes, ovadas y lanceoladas, puntiagudas, poco viscosas y velludas, de color verde pálido, olor narcótico, con un sabor acre amargo y nauseoso (González y Gurdíán, 1998).

#### **2.3.1.3. Flor**

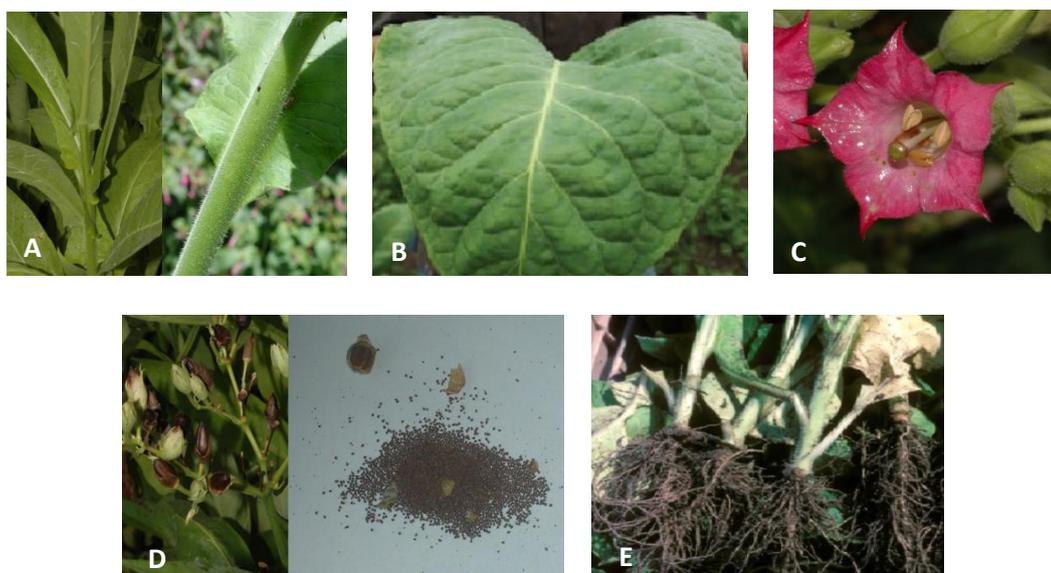
Estas tienen una estructura simétrica que parten de la zona más elevada de los tallos, agrupadas en racimo (Figura 2.10 C). Tiene 5 pétalos fusionados, presentan una coloración que va desde el blanco verdoso al rosa, dependiendo de la variedad (González y Gurdíán, 1998). La floración comprende desde la primavera alargándose hasta todo el verano (Figura 2.10 D) (Romero, 2016).

#### 2.3.1.4. Fruto

Localizado en una cápsula oval de dos celdas (Figura 2.10 E), con gran cantidad de semillas diminutas, existiendo más de mil por fruto, las mismas que germinan dentro de 10 a 20 días (González y Gurdíán, 1998).

#### 2.3.1.5. Raíz

Es levemente ramosa, fibrosa y blanca, de profundidad corta (Figura 2.10 F), aquí en las raíces es donde se produce la nicotina que llega a acumularse en las hojas (González y Gurdíán, 1998).



*Figura 10.* Fisiología de la planta.

Tomado de (Kumawat *et.al.*, 2016).

- a. Tallo de tabaco.
- b. Hoja *Nicotiana tabacum*.
- c. Flor *Nicotiana tabacum*.
- d. Semillas de *Nicotiana tabacum*.
- e. Raíces *Nicotiana tabacum*.

### 2.3.1.6. Distribución

*N. tabacum* está catalogada de origen americano y ha sido ampliamente introducido para el cultivo comercial en el resto del mundo, sobresaliendo en Indias Occidentales, Centro América y Sudamérica, así como en las Islas del Pacífico. Teniendo también presencia de cultivo en Asia y Europa. Eriksen *et al.* (2015) informan que la hoja de tabaco se cultiva en un aproximado de 124 países, teniendo una expansión de cultivo en África, con más de 20 países que ahora lo cultivan.

### 2.3.1.7. Taxonomía

Tabla 2.  
*Taxonomía de N. tabacum*

Dominio	Eukaryota
Reino	Plantae
Filo	Spermatophyta
Sub filo	Angiospermae
Clase	Dicotyledonae
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Genero	<i>Nicotiana</i>
Especie	<i>Nicotiana tabacum</i>

### 2.3.2. El tabaco como modelo de estudio en Biotecnología Vegetal

*Nicotiana tabacum* tiene gran relevancia tanto en el mundo agrícola como el científico, ya que esta es una planta modelo (Shang *et al.*, 2014; Yuan *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2014). *N. tabacum* a lo largo del tiempo ha sido un cultivo de relevancia para diferentes estudios, ya que ofrece distintas ventajas

prácticas por encima de otros cultivos (Tremblay, 2010). Asimismo, este modelo es catalogado de suma importancia en la investigación científica, ya que ha sido utilizado para diferentes estudios fisiológicos y principalmente como un biorreactor verde. (Xiao, 2015). Asimismo, *N. tabacum* tiene una transformación genética fácil, alto contenido de proteínas y un tiempo de generación corto (Xiao, 2015). Por estas razones, el tabaco ha sido comúnmente empleado en varios estudios de rutas metabólicas (Ji et al., 2018), estrés oxidativo (Langebartels, 1991), ha demostrado ser un excelente biorreactor verde produciendo una amplia gama de proteínas terapéuticas como: anticuerpos, vacunas, y moléculas inmunomoduladoras (Xiao, 2015).

### **2.3.2.1. Modos de Empleo**

Las primeras experiencias relacionadas con el cultivo de tejidos son de hace más de una década, pero hoy en día se sigue desarrollando esta área ya que ha logrado desarrollar varias áreas de la biotecnología vegetal con la investigación e implementación del cultivo celular, algunas de ellas son: la germinación *in vitro* de semillas, asimilación de nutrientes necesarios para diferentes plantas, combatir diferentes patógenos de plantas y estudios a nivel del genoma. Es así que, hoy en día esta técnica tiene varias aplicaciones, siendo algunas de ellas (Snyman *et al.*, 2011):

- Propagación masiva de especies vegetales difíciles de propagar por métodos convencionales.
- Clonación de especies vegetales con características de interés económico.
- Obtención de especies vegetales libre de virus.
- Obtención de semillas sintéticas con alginato de sodio.
- Conservación de germoplasma.
- Obtención de metabolitos secundarios.
- Mejora genética de especies vegetales.
- Producción de individuos haploides.

- Diversos estudios fisiológicos.

Es así que, para realizar todos estos estudios, en cuanto a cultivo celular se emplean especies vegetales como modelos de investigación y uno de los más empleados es *N. tabacum*, por sus características ya mencionadas anteriormente. Como por ejemplo en el trabajo de Barretto *et al.*, (2017) se demostró la sensibilidad al corte de la regeneración de brotes *in vitro* del callo de *N. tabacum* por inmersión periódica en medios líquidos, observando reducciones significativas en el crecimiento y la actividad metabólica, revelando así que estos parámetros hidrodinámicos deben tenerse en cuenta para el diseño y la ampliación de biorreactores de inmersión para el cultivo de tejidos de plantas, especialmente para la agricultura molecular de biofármacos transplastómicos (Barretto *et al.*, 2017).

Por otro lado, *N. tabacum* también es empleada para la genética, como lo demostró Jurecková *et al.* (2016) en un estudio donde se investigó la telomerasa que es un complejo de ribonucleoproteína responsable del mantenimiento de los telómeros, ya que se encontró que *N. tabacum* al ser una planta alotetraploide posee tres variantes de secuencia del gen que codifica la telomerasa inversa, dos de ellos derivados del genoma materno (*N. sylvestris*) (TERT-Cs, TERT-D) y uno originado del genoma paterno (*N. tomentosiforme*) (TERT-Ct). Realizando diferentes pruebas se comprobó la existencia y el patrón de transcripción del tabaco TERT parálogo, representando un fenómeno interesante e indicando su significado funcional. Demostrando una vez más, que las especies de *Nicotiana* son plantas apropiadas y útiles como modelo de estudios de biología de los telómeros (Jurecková *et al.*, 2016).

Asimismo, *N. tabacum* ha sido empleado comúnmente tanto para el estudio de cloroplastos como en *Molecular Farming*. Esto se lo evidencia en el trabajo de Pantaleoni *et al.* (2013), donde se planteó el uso de plantas como biofábricas. Esto, con el fin de producir enzimas recombinantes que puedan ser una posible alternativa a la microbiana de fermentación. En cuanto a la acumulación de enzimas en cloroplastos, se centró el estudio en la eficiencia fotosintética de las

plantas transplastómicas en el campo, donde podrían estar expuestas a estrés abiótico, tales como alta intensidad de luz y alta temperatura. Analizando cómo el alto nivel de acumulación de un termoestable en este caso xilanasasa en cloroplastos de tabaco no afecta el rendimiento fotosintético de plantas transplastómicas. Llegando a la conclusión de que la enzima recombinante se encontró estable durante el desarrollo del explante, planta adulta y a largo plazo (Pantaleoni, 2013; Rice *et al.*, 2013).

### 3. CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

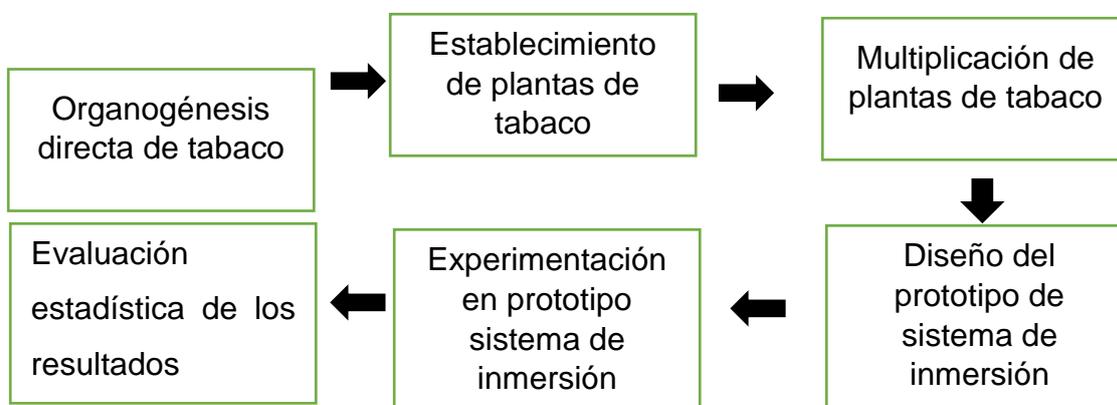


Figura 11. Diagrama de flujo de la metodología.

#### 3.2. Obtención del material vegetal.

El material vegetal se obtuvo a partir de un proceso de organogénesis directa. Para lo cual se utilizó medio basal MS, se colocó una solución de macroelementos, de microelementos y hierro. Posteriormente, se pesó sacarosa (30 g/L), se ajustó el pH a 5.7 y finalmente, se mezcló la solución, se añadió agar (7 g/L), y se dispensaron 20 mL en cada frasco de vidrio, los cuales fueron posteriormente autoclavados a 121 °C por 15 min.

### **3.3. Establecimiento de plantas de tabaco.**

Para la elaboración del medio de cultivo de establecimiento se partió del método modificado de Rodríguez *et al.*, (2015), para lo cual se utilizó una solución de macroelementos (1X), microelementos (1X), hierro (1X) de medio MS, suplementado con 6-BAP (1 mg/L). Se utilizó sacarosa (30 g/L) como fuente de carbono, se ajustó el pH a 5.7, se mezcló la solución, se añadió agar (7 g/L), y se dispensaron 20 mL en cada frasco de vidrio, los cuales fueron posteriormente autoclavados. Las yemas de las plantas obtenidas en el paso anterior, fueron utilizadas como material de partida para el establecimiento.

### **3.4. Multiplicación de plantas de tabaco en medio semisólido.**

Para la elaboración del medio de cultivo de multiplicación se partió del método modificado de Saucedo *et al.* (2008), para lo cual se colocaron macroelementos (1X), microelementos (1X), hierro (1X) de MS, suplementado con 6-BAP (1 mg/L) y AIA (1 mg/L). Se utilizó sacarosa (30 g/L) como fuente de carbono, se ajustó el pH a 5.7, se mezcló la solución, se añadió agar (7 g/L), y se dispensaron 20 mL en cada frasco de vidrio, los cuales fueron posteriormente autoclavados. Las yemas establecidas en el paso anterior, fueron utilizadas como material de partida para la multiplicación en medio semisólido.

### **3.5. Diseño del prototipo de sistema de inmersión temporal.**

En el presente trabajo se desarrolló un prototipo de sistema de inmersión temporal autoclavable. El sistema consta de una estructura en forma de “L”, la cual soportará en la base al frasco, conjuntamente con el medio líquido y en la parte superior al rotor, el cual ejercerá un movimiento circular, el cual será convertido en movimiento lineal por un brazo conector. Este sistema estará conectado a una varilla de vidrio y está a la canastilla que llevará los explantes al medio de cultivo con un movimiento tipo “ascensor”. Cuando el rotor active el sistema y la canastilla se sumerja, este proceso será programado como “tiempo

de inmersión”, y cuando ejerza el movimiento contrario, será programado como “tiempo de desecación”. La programación de los tiempos se realizará en un arduino (arduino UNO).

### 3.6. Diseño del plan experimental para validación del prototipo.

Para la validación del experimento, se utilizará una fase de multiplicación en biorreactor, con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, intensidad de luz de 3000 luxes, con un tiempo de cultivo de 7 días. Una vez que se construyeron los biorreactores, se definió el diseño experimental para la validación. Para ello, se planteó un diseño factorial Plackett Burman, el cual cuenta con 8 tratamientos, cada uno con dos niveles de variación (tabla 3). El experimento se realizó con dos réplicas independientes.

Tabla 3.  
*Variables independientes*

<b>Factor</b>	<b>Nombre del factor</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>Unidades</b>
<b>A</b>	Tiempo de inmersión	5	15	minutos
<b>B</b>	Sacarosa	15	30	g/L
<b>C</b>	Temperatura	28	22	°C
<b>D</b>	Concentración de sales MS	0,5	1	x
<b>E</b>	Volumen de medio de cultivo	100	120	mL
<b>F</b>	Color de Canasta	Translúcido	Blanco	-
<b>G</b>	Frecuencia de Inmersión	3	8	h

Las variables de respuesta y su determinación cuantitativa fueron las siguientes:

- Coeficiente de multiplicación: se determinó por el número de brotes finales con respecto al número de brotes iniciales.

- Longitud de los brotes de yemas axilares (cm): se determinó con una regla graduada y se midió desde la base del pseudotallo hasta la inserción de la primera hoja.
- Grado de oxidación según escala de Novak et al. (1994):
  - Grado 0: no hubo oxidación, coloración del explante de blanco-amarillo crema.
  - Grado 1: Incipiente coloración “carmelita” sin llegar a la necrosis del tejido
  - Grado 2: Aproximadamente el 25% de tejido necrótico en la base del explante
  - Grado 3: 50% de tejido necrótico en la base del explante
  - Grado 4: Aproximadamente 75% de tejido necrótico en la base del explante con penetración
  - Grado 5: 100% de tejido necrótico en la base del explante con penetración, necesitando cortes profundos para lograr que la asimilación de nutrientes sea efectiva
- Número de hojas de los brotes de yemas axilares: se contaron las hojas que estaban abiertas.

En la tabla 4 se encuentra expresada la matriz codificada y decodificada del diseño *Plackett-Burman*.

Tabla 4.

*Matriz codificada y decodificada del diseño experimental Plackett-Burman.*

Columna	A (min)		B (g)		C (°C)		D (x)		E (mL)		F *		G (h)	
	C**	D**	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	C	D
1	+	15	-	15	-	28	+	1	-	100	+	B	+	8
2	+	15	+	30	-	28	-	0,5	+	120	-	T	+	8
3	+	15	+	30	+	22	-	0,5	-	100	+	B	-	3
4	-	5	+	30	+	22	+	1	-	100	-	T	+	8
5	+	15	-	15	+	22	+	1	+	120	-	T	-	3
6	-	5	+	30	-	28	+	1	+	120	+	B	-	3
7	-	5	-	15	+	22	-	0,5	+	120	+	B	+	8
8	-	5	-	15	-	28	-	0,5	-	100	-	T	-	3

Nota: \* B: blanco; T: transparente, \*\* C: codificado; D: decodificado.

### 3.7. Evaluación estadística de los resultados

Los resultados experimentales fueron analizados con una ANOVA para determinar diferencias significativas entre tratamientos. Se realizó la prueba de Duncan para determinar los mejores tratamientos, utilizando un alfa de 0,05. Para todo el análisis estadístico se utilizó el programa IBM SPSS Statistics 2018.

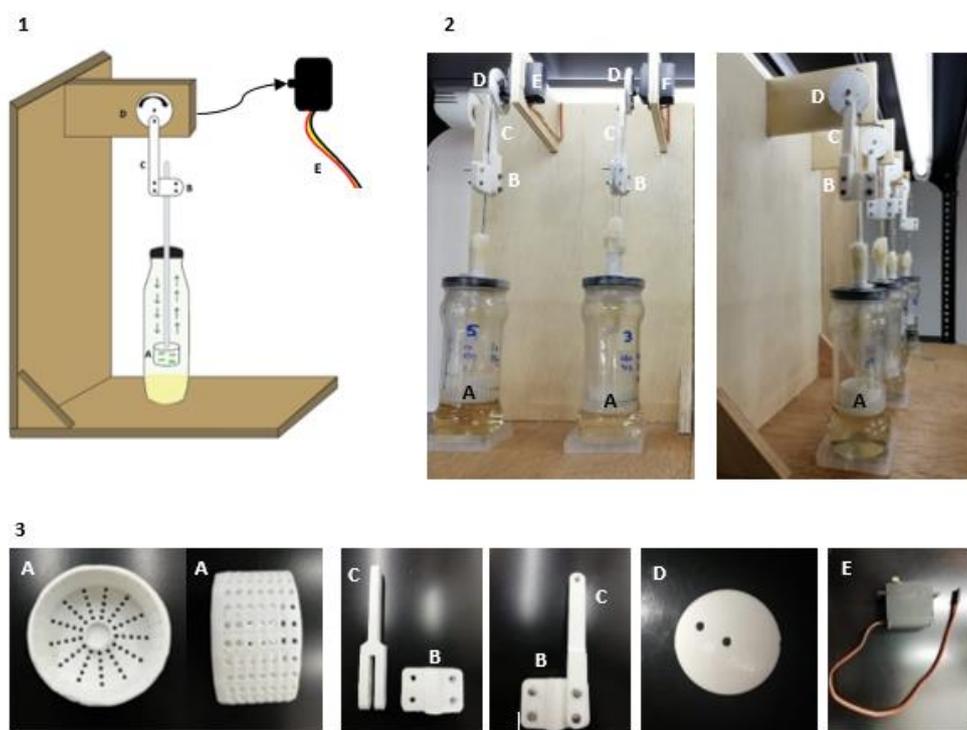
## 4. CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.2. Construcción y funcionamiento mecánico y eléctrico del prototipo del SIT

El prototipo SIT propuesto fue ensamblado y puesto en funcionamiento durante 7 días seguidos, en los cuales no se presentaron fallas mecánicas ni eléctricas.

Dicho prototipo constó de 5 piezas principales, las cuales fueron: canasta de inmersión temporal impresa en 3D, la misma que presentó resistencia a temperaturas mayores a 100°C (condiciones de esterilización), resistió hasta 4

repeticiones seguidas en estas condiciones sin presentar deformación; brazo conector entre circunferencia móvil y abrazadera, el cual funcionó correctamente, convirtiéndolo el movimiento circular en lineal; rotor, asimismo este se adaptó correctamente al prototipo ya que su fuerza fue óptima para llevar a cabo el movimiento lineal de la varilla; tapón de algodón, este funcionó adecuadamente, ya que la contaminación del medio de cultivo líquido en todas las repeticiones fue nula; circunferencia móvil; abrazadera de varilla de vidrio; varilla de vidrio. Todo lo mencionado previamente se observa en la figura 4.1.

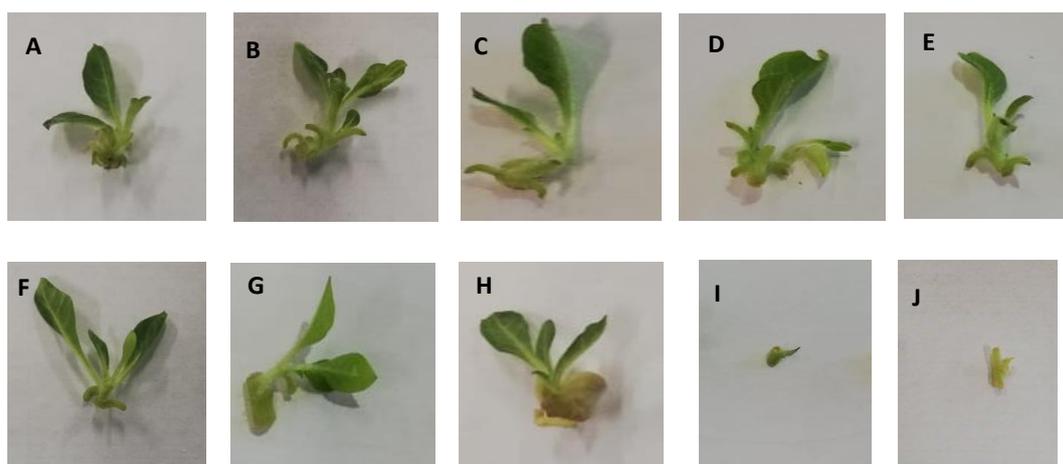


*Figura 12.* Prototipo de sistema de inmersión temporal (SIT).

1. Esquema del prototipo de SIT.
2. SIT ensamblado y funcionando.
3. Partes del SIT:
  - a. Canasta porta explantes, sumergible, impresa en 3D.
  - b. Agarradera de varilla.
  - c. Brazo conector entre circunferencia móvil y agarradera.
  - d. Circunferencia móvil.
  - e. Motor.

### 4.3. Validación del prototipo.

Se obtuvieron resultados positivos en todos los tratamientos. Como se observa en la figura 4.2, todos los tratamientos con excepción de los controles desarrollaron brotes. Se puede observar que el tratamiento 2, 3, 4 y 6 tuvieron un mayor número de brotes en comparación con los demás tratamientos. Por otro lado, se aprecia que los 7 días de experimentación fueron suficientes para comprobar el funcionamiento del prototipo, ya que existió crecimiento, en la longitud del brote. Asimismo, se observa que el medio MS y la sacarosa influyeron positivamente en todos los tratamientos, ya que al comparar visualmente con el control se pueden observar diferencias en cuanto a las características ya mencionadas.



*Figura 13.* Resultados de los tratamientos posterior a 7 días.

(A) Tratamiento 1, (B) Tratamiento 2, (C) Tratamiento 3, (D) Tratamiento 4, (E) Tratamiento 5, (F) Tratamiento 6, (G) Tratamiento 7, (H) Tratamiento 8, (I) Control a 22 °C, (J) Control a 28 °C.

Los explantes del tratamiento 1 (Figura 4.2 A) generaron brotes sin oxidación con una altura baja en comparación al resto de explantes. Los explantes del tratamiento 2 (Figura 4.2 B) tuvieron un crecimiento vertical pronunciado, desarrollando varios brotes, en el cual resaltan 2 de ellos por su longitud, además que estos no presentan señales de oxidación. Los explantes del tratamiento 3 (Figura 4.2 C) poseen un desarrollo medio, ya que se aprecia que

generó pocos brotes. Sin embargo, estos se desarrollaron, presentando una mínima señal de oxidación en la base del pseudotallo. Los explantes del tratamiento 4 (Figura 4.2 D) poseen un crecimiento vertical pronunciado con un número de brotes bajo y no presentan señales evidentes de oxidación. En la figura 4.2 E, se observa que los explantes del tratamiento 5 tienen un desarrollo vertical medio y un desarrollo horizontal nulo, así como un número de brotes relativamente bajo, sin presentar señales de oxidación. En los explantes del tratamiento 6 (Figura 4.2 F) se observa que la oxidación es nula y el desarrollo de brotes es pronunciado, asimismo su longitud fue pronunciada. Tanto los explantes del tratamiento 7 como el del 8 (Figura 4.2 G, H) presentan un desarrollo vertical corto de los brotes, así como un número de brotes bajo, sin presentar oxidación. En cuanto a los controles (Figura 4.2 I, J) no se observaron cambios desde el inicio de la experimentación. Demostando así que, el prototipo desarrollado es biocompatible, pues los explantes control no murieron a pesar de estar solo en agua, no crecieron, pero permanecieron vivos durante toda la experimentación.

#### 4.4. Grado de oxidación.

Se puede observar en la tabla 7 que la oxidación en todos los tratamientos y controles fue mínima, por de abajo del segundo nivel en la escala de Novak entre el nivel 0 y el nivel 1.

Tabla 5.  
Grado de oxidación según la escala de Novak

Oxidación	
Tratamientos	Promedio del grado de oxidación según escala de Novak <i>et al.</i> (1994)
Control 22 °C	0,5
Control 28 °C	0
Tratamiento 1	0,25
Tratamiento 2	0,25

Tratamiento 3	0,13
Tratamiento 4	0,13
Tratamiento 5	0,38
Tratamiento 6	0,38
Tratamiento 7	0,38
Tratamiento 8	0,38
Promedio General	0,3

La tasa de oxidación del material vegetal se reduce cuando se realiza cultivo *in vitro* en SIT's, ya que existe una renovación constante de la atmósfera gaseosa y el tejido no está constantemente en contacto con H<sub>2</sub>O, si no solo por periodos, a diferencia de los cultivos en medio semisólido, los cuales están en contacto permanente con los explantes, lo que provoca estrés hídrico, oxidación y necrosamiento. Es así que el necrosamiento de tejidos u oxidación es el resultado de la generación de radicales libres y la oxidación de compuestos fenólicos catalizado por la enzima polifenol oxidasa con el fin de originar quinonas, fenómeno denominado fenolización (Campbell y Reece, 2010, pp. 160-165). Dichos radicales libres oxidan tanto el tejido de la planta como el medio de cultivo, provocando que el medio tenga una vida útil más corta, además de la pérdida de material vegetal (Campbell y Reece, 2010, pp. 160-165 y Azofeifa, 2009).

Tanto en investigaciones de plátano como de cacao se demostró que la propagación en SITs disminuye la tasa de oxidación, ya que existe una renovación constante de la atmósfera lo cual resulta favorable para el crecimiento del explante (García, 2013), puesto que no existe acumulación de gases y el dióxido de carbono no está restringido, así como los nutrientes están más bio-disponibles para la planta a que existe una mejor transferencia de nutrientes al estar en medio líquido, pero el permanente contacto del explante con el medio líquido tampoco es recomendable ya que no existe la suficiente oxigenación, viéndose afectado el crecimiento del explante, así como se comprobó en un estudio de zanahoria (*Daucus carota*) en el cual creció 2.6

veces más cuando se aplicó aireación al medio (Harris, 1983). Por lo redactado anteriormente, se determina la importancia de la frecuencia y periodo de inmersión para así brindar la suficiente oxigenación al medio, evitando también la hiperhidricidad, la misma que también puede ser evitada con concentraciones bajas, tanto de sales como de sacarosa y aumentando la luz (Hvoslef-Eide y Preil, 2015 y Cassells, 2001).

Finalmente, con los resultados expuestos, se puede aseverar que los resultados obtenidos en la presente investigación, así como el uso de biorreactores en general para la masificación de plantas, son superiores a las tecnologías disponibles en la actualidad, como los medios semisólidos y los cultivos en medio líquido en relación a la tasa de oxidación de los explantes, y resultarían una buena alternativa para la masificación de plantas libres de oxidación. Sin embargo, hacen falta más pruebas para poder determinar su real aplicación en diferentes especies.

#### **4.5. Número de hojas.**

En el análisis estadístico para la variable “número de hojas”, se encontraron diferencias significativas entre tratamientos. La prueba de Duncan encontró que los mejores tratamientos según  $\alpha = 0.05$  para esta variable son los tratamientos 6 y 8 (Figura 4.3). El promedio de hojas fue de 6.5 por tratamiento, siendo este el mayor número de hojas de todo el experimento. Es importante resaltar que ninguno de los tratamientos presentó hiperhidricidad.

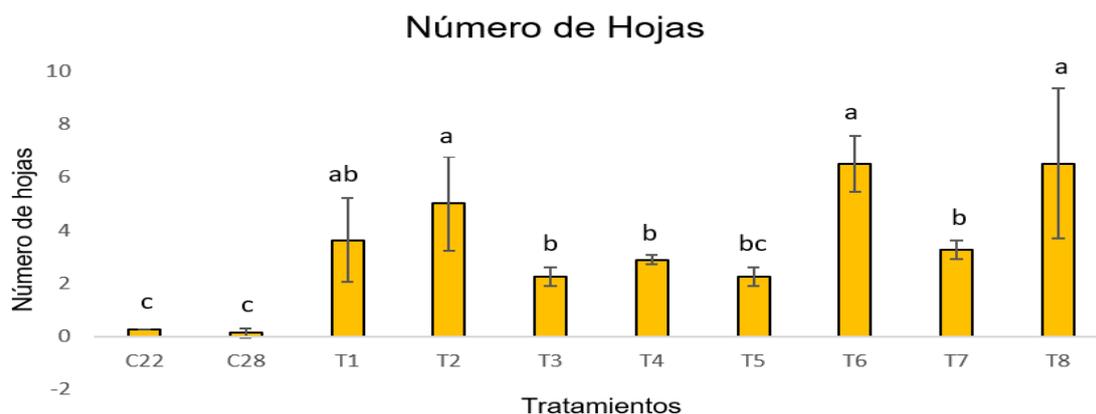


Figura 14. *Número de hojas.*

Estos resultados podrían atribuirse a la influencia de ciertos parámetros sobre la variable estudiada. Según Basail *et al.* (2015) se considera al tiempo y frecuencia de inmersión como factores importantes en la micropropagación vegetal utilizando la metodología SIT. En este estudio, en el cual se utilizó como material vegetal el plátano vianda (*Musa x paradisiaca*), se obtuvieron los mejores resultados con una frecuencia de 6 h y un tiempo de inmersión de 10 min. Por otro lado, Akdemir *et al.* (2014) al utilizar un tiempo de inmersión de 16 y 24 min con una frecuencia de 16 h, obtuvieron los mejores resultados en el cultivo de pistacho (*Pistacia atlantica*). Asimismo, Basail *et al.* (2013) determinaron que, con una frecuencia de 3 h y 10 min de inmersión se obtiene el mayor número de hojas en el cultivo de plátano vianda (*Musa x paradisiaca*).

Teniendo conocimiento de los diversos resultados y de la variación entre especies, se considera necesario determinar el tiempo y frecuencia óptimos para cada especie vegetal, ya que la eficiencia de los distintos SIT's dependerá en gran proporción de un buen ajuste de dichos parámetros (Berthouly y Etienne, 2005; Frometa *et al.*, 2016; Akdemir *et al.*, 2014; Basail *et al.*, 2013; Basail *et al.*, 2015). Por ejemplo, en el presente estudio se obtuvo el mejor resultado con un tiempo de inmersión de 5 min y una frecuencia de inmersión de 3 h para el cultivo de *N. tabacum*, por lo que se puede considerar este ajuste de parámetro como uno de los mejores para el cultivo en SIT de esta especie.

Por otro lado, se puede notar que se obtuvo un mayor número de hojas cuando se sometieron los explantes a 28 °C. Esto pudo deberse a que según Gozález y Gurdíán (1998) el tabaco se desarrolla con mayor eficacia en climas subtropicales que van desde los 18 °C a 28 °C, por lo que el resultado del número de hojas mostró mayor crecimiento en dicha temperatura (la cual se encuentra dentro del rango), aunque no existieron diferencias significativas entre ambas temperaturas (Figura 4.3). Este resultado sería útil para optimizar recursos energéticos al micropropagar en SITs, debido a que, al no existir diferencias significativas para este parámetro en particular, se podría mantener el mismo como fijo a 22°C en el cultivo en SIT. Cabe recalcar que este resultado se presentó únicamente para la variable “número de hojas” (Figura 4.3). Para las otras 2 variables estudiadas (Figuras 4.4, 4.5) no se observó influencia de la temperatura, por lo que se considera necesario realizar estudios más a profundidad sobre este parámetro.

En cuanto a la influencia del volumen/explante sobre la variable “número de hojas”, se puede observar que, a mayor volumen de medio mayor número de hojas. Según Etienne *et al.* (2002) el volumen es un factor importante para la multiplicación de los explantes. Por ejemplo, en el estudio de Bassail *et al.* (2013) se obtuvo un mayor número de hojas cuando se usaron 60 mL/explante (volumen mayor de todos los experimentados) para cultivo de plátano vianda (*Musa x paradisiaca*) y en un estudio en piña (*Ananas comosus*) se determinó que el mejor volumen fue de 200 mL de medio líquido y que al sobrepasar este volumen se limitaba el coeficiente de multiplicación (Escalona *et al.*, 1999). Sin embargo, en el presente estudio no hubo diferencia significativa entre los dos volúmenes experimentados, lo que podría atribuirse a la influencia del tiempo de experimentación, ya que el experimento se implementó durante 7 días. Por el contrario, en un estudio de micropropagación de plantas de piña (*Ananas comosus* L. Merr) en SIT se utilizó un tiempo de cultivo de 42 días y determinaron finalmente que, a medida que se utilizó un mayor volumen se obtuvo una mayor tasa de multiplicación, lo que lleva a la conclusión de que el tiempo de cultivo presenta una relación directa con el volumen/explante dentro

de una experimentación en SIT (Escalona *et al.*, 2019). Por esta razón, es de gran utilidad implementar experimentos los cuales evalúen tiempos de experimentación más largos para dilucidar, con más claridad la influencia de esta variable sobre el número de hojas en el SIT desarrollado en este estudio.

Otro de los factores evaluados fue el color de la canasta. Se puede observar que el número de hojas cultivadas en canasta translúcida fue menor al de las cultivadas en canasta blanca. Esto podría deberse a varios factores; el más evidente apunta a que la canasta blanca tiene un mejor índice de reflexión de la luz (casi un 100%), lo cual permite una distribución más uniforme de la luz por todo el espacio de crecimiento. La luz es uno de los factores más importantes en el crecimiento vegetal, pues la planta la utiliza como fuente de energía para su proceso de fotosíntesis. Además, los cambios en la intensidad de luz y la longitud de onda pueden manipular el metabolismo de la planta, esto comparado con la canasta traslúcida, que posee un índice de reflexión de luz no mayor al 60%. Las plantas, al no recibir una buena calidad y cantidad de luz, merman su crecimiento, el cual se ve reflejado en el tamaño y número de hojas (Insht., 2018; Beer y Levy, 1983; Darko *et al.*, 2014). Cabe recalcar que este fenómeno solo se observó en esta variable de respuesta. Para las otras, ocurrió algo distinto que se analizará posteriormente.

La sacarosa es una importante fuente de carbono ya que es el carbohidrato más común en la savia del floema de numerosas especies vegetales. Es por esta razón, que la influencia de esta es vital para un proceso de desarrollo morfogénico y organogénico (Yaseen *et al.* 2013). En este estudio en particular, se observó que los medios que tenían una mayor concentración de sacarosa y sales MS presentaron un mayor número de hojas, en comparación con los que tenían menores concentraciones. Esto está relacionado a las numerosas funciones atribuibles a la fuente de carbono en el medio de cultivo (Yaseen *et al.* 2013). Koch (1996) manifestó que las distintas fuentes de carbono, entre ellas la sacarosa, actúan sobre la expresión de numerosos genes en especies vegetales y que además presentan vínculos con los diferentes procesos

metabólicos y de desarrollo de la planta. Por ejemplo, en un estudio sobre la regulación metabólica de los genes del maíz (*Zea mays*), se logró determinar que el mecanismo y sitio de escisión de la sacarosa dentro de la célula podrían perjudicar el tipo y la magnitud de señal generada para el metabolismo de la sacarosa (Koch, *et al.*, 1996). Por otro lado, en un estudio sobre la represión metabólica de la transcripción en plantas superiores, donde utilizaron protoplastos mesófilos de maíz (*Zea mays*), se demostró que la actividad transcripcional de 7 promotores relacionados con el gen fotosintético del maíz se ve inhibida por los productos finales de la fotosíntesis: glucosa y sacarosa, y además por otra fuente de carbono utilizada en el estudio: acetato exógena (Sheen, 1990). Se demostró a su vez que, un exceso en la fuente de carbono podría inhibir el crecimiento de los tejidos vegetales. Tal y como se reporta en un estudio de manzana (*Pyrus malus* L.) y uno de palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.), en los cuales se demostró que con mayores concentraciones de azúcares se obtiene un efecto inhibitorio del crecimiento de la planta (Hilae y Te-chato, 2005; Yaseen *et al.*, 2009; Yaseen *et al.*, 2013). Finalmente, la fuente de carbono, cualquiera que sea, es esencial en el desarrollo vegetal *in vitro*, al ser este un proceso con altos requerimientos energéticos. A su vez, su uso puede variar según la especie vegetal y la etapa del cultivo, incluido este estudio, por lo que se recomienda hacer más estudios con diferentes concentraciones y tipos de fuente de carbono para la propagación vegetal en el SIT propuesto.

Por otro lado, la influencia que presentó el medio MS sobre esta variable, puede deberse a la concentración de sales en la formulación del medio de cultivo. Es decir, el tratamiento 6 pudo ser el mejor ya que tuvo mayor concentración de sales al ser un medio MS 1x, en comparación a la otra concentración que fue 0,5x. Según Ponmurugan y Kumar (2011) la formulación del medio de cultivo es un factor clave para el correcto desarrollo *in vitro* de los explantes. Los dos componentes más importantes de un medio de cultivo son la fuente de carbono (en este caso se usó sacarosa, de la cual ya se discutió previamente) y las sales inorgánicas. Sin embargo, un exceso de concentración

de sales podría desembocar en estrés salino y esto a su vez podría reducir el desarrollo de los explantes, ya que se produciría una limitación de la absorción de agua por parte de los mismos y se podría presentar hiperhidricidad (Almansouri y Lutts, 2001). Por otro lado, un déficit de la concentración de sales también podría afectar el crecimiento de la planta, provocando clorosis y necrosis en las hojas, además de deformación foliar; la longitud del tallo se podría ver afectada, al igual que el proceso de la fotosíntesis, entre otros (Ponmurugan y Kumar, 2011). Por lo que se recomienda hacer estudios más amplios para determinar las concentraciones óptimas de sales para evitar daños en los explantes y por ende pérdida del material vegetal en el presente SIT.

#### 4.6. Longitud de brote.

En el análisis estadístico para la variable “longitud del brote”, se encontraron diferencias significativas entre tratamientos. La prueba de Duncan encontró que el mejor tratamiento según  $\alpha = 0.05$  fue el 6 (Figura 4.4). Obteniendo un promedio de 0.89 cm, siendo ésta la mayor longitud de brote de todos los tratamientos del experimento.

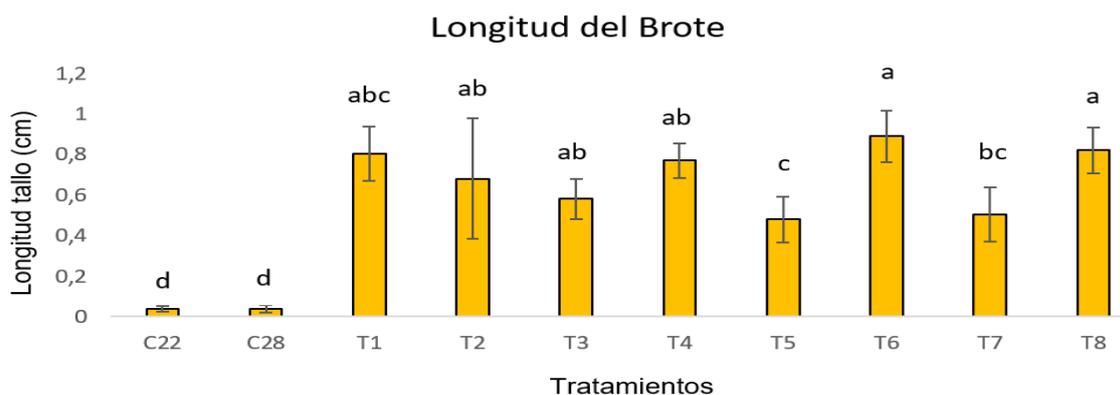


Figura 15. Longitud del brote.

Estos resultados podrían atribuirse a la influencia de ciertos parámetros sobre la variable estudiada. Si se observa la figura 4.4 se puede notar que se obtuvo una mayor longitud de brote cuando se sometieron los explantes a 28°C. Esto por la misma razón previamente expuesta en los resultados del número de hojas. En cuanto a la influencia del volumen/explante sobre la longitud del brote

se puede ver que la mayor longitud se obtuvo con una cantidad de 25 mL por explante. Es así que, Georgiev *et al.* (2014) demostró que al colocar un mayor volumen en un SIT “*Wave biorreactor*” para cultivo *in vitro* de *N. tabacum*, las plantas presentan mayor crecimiento. Asimismo, en un estudio de multiplicación de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) en el SIT “BIT cubano” o *Twin Flask* se determinó que el volumen óptimo por explante es 40 mL (siendo este el mayor volumen experimentado) (Lorenzo *et al.*, 1998). Sin embargo, para esta variable, al igual que para “número de hojas”, se presentó un resultado que va en desacuerdo con los estudios previamente mencionados. Se podría atribuir este resultado al tiempo de cultivo, ya que en el presente se experimentó solo por un periodo de 7 días.

Otro de los factores evaluados fue el color de la canasta. Se puede observar que la longitud de los brotes en canasta blanca no tuvo diferencia significativa comparados con los cultivados en canasta traslúcida.

Se puede observar, además, que la influencia de la concentración de sacarosa sobre la longitud del brote, donde se evidencia que, a mayor concentración, mayor longitud del mismo podría atribuirse a la misma razón previamente expuesta en la variable “número de hojas”.

Por otro lado, se puede notar que no hubo mayor influencia de la concentración de MS sobre la longitud del brote, ya que no se observaron diferencias significativas entre las dos concentraciones experimentadas para esta variable de respuesta.

En cuanto a la inmersión temporal se ha demostrado que realizar micropropagación en medio líquido con intervalos de inmersión y desecación tiene un mejor resultado que el cultivo convencional en medios sólidos (Etienne *et al.*, 2002). Así como se demostró en un estudio de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. Ex Andrews) que, con tiempos de inmersión cortos de 2 min e inmersiones más frecuentes de 4 h, se previene la hiperhidricidad y el callo

(Ramos, 2014). Sin embargo, para esta variable no se presentaron diferencias significativas en cuanto al tiempo y frecuencia de inmersión. Se recomienda optimizar el SIT con los factores que fueron significativos en esta variable, ya que la longitud del brote es una variable de respuesta que al ser correctamente evaluada y optimizada puede ayudar a eludir un paso de la micropropagación como lo es la elongación, el cual resultaría importante para el ahorro de tiempo y recursos de económicos (Hvoslef-Eide y Preil, 2015).

#### 4.7. Variable coeficiente de multiplicación.

En el análisis estadístico para el coeficiente de multiplicación, se encontraron diferencias significativas entre tratamientos. La prueba de Duncan encontró que los mejores tratamientos según  $\alpha = 0.05$  son los tratamientos 6 y 8 (Figura 4.5). Dando como resultado un promedio de 2.38 (tratamiento 6) y 2.05 (tratamiento 8) en cuanto al coeficiente de multiplicación para ambos tratamientos, siendo estos los mayores coeficientes de todo el experimento.

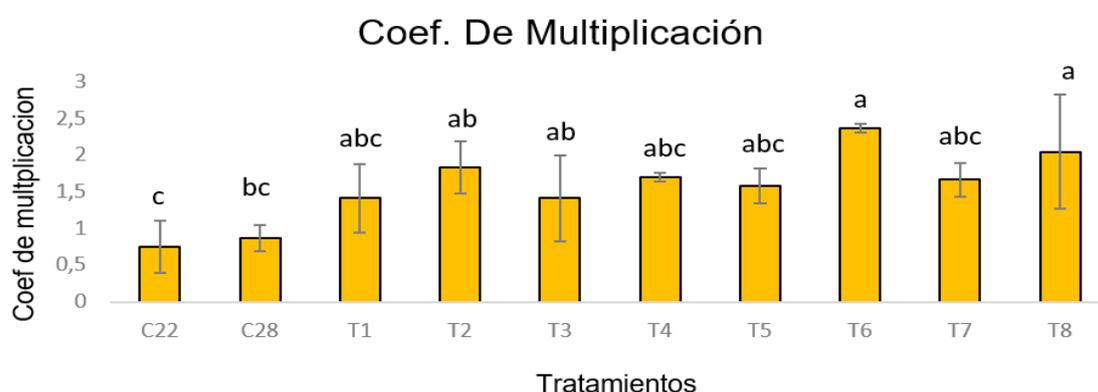


Figura 16. Coeficiente de multiplicación.

Estos resultados podrían deberse a la influencia de algunos parámetros entre los estudiados. En el estudio de Ramos *et al.* (2014) se determinó que el volumen fue un importante factor con relación a la tasa de multiplicación, resultando 25 mL por explante el mejor volumen para la propagación de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) (Ramos *et al.*, 2014).

A su vez, se ha visto que la micropropagación en sistemas de inmersión temporal es más eficiente, por los factores redactados anteriormente y resaltando la absorción de nutrientes de los medios líquidos, así como la renovación de la atmósfera. Estos factores provocan que el coeficiente de multiplicación sea elevado, en comparación a la micripropagación convencional y teniendo en consideración que este estudio tuvo una duración de 7 días (Alvarenga, 2015). Se puede observar en la figura 4.5 que el coeficiente de multiplicación es similar en todos los tratamientos. Lo cual puede deberse a la inexistencia de biorreguladores en el medio, ya que se ha visto que los bioreguladores de plantas desempeñan un papel importante en el control del crecimiento, multiplicación y desarrollo de las mismas. Sin embargo, una incorrecta combinación o concentración de los biorreguladores puede provocar inhibición de otros bioreguladores o de procesos biológicos, desencadenando daños en el explante.

Por estas razones, se recomienda realizar investigaciones en el SIT propuesto en el presente estudio empleando bioreguladores. Con el fin de obtener una mayor eficiencia. Ya que una correcta formulación del medio de cultivo combinado con un SIT adecuado desembocaría en un coeficiente de multiplicación elevado, resultando en un ahorro de recursos tanto económicos como de tiempo.

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. Conclusiones

Se desarrolló satisfactoriamente un prototipo de sistema de inmersión temporal (SIT), el mismo que funciona adecuadamente para la micropropagación *in vitro* de *Nicotiana tabacum* en medio basal líquido.

Para la variable número de hojas, se determinó que los factores: frecuencia de inmersión, tiempo de inmersión, volumen, temperatura, concentración de MS, concentración de sacarosa, color de canasta de inmersión; fueron significativos.

Para la variable longitud de brote, se determinó que el factor concentración de sacarosa fue significativo.

Para la variable coeficiente de multiplicación, se determinó que el factor volumen fue significativo.

Con todo esto, se concluye que se validaron las condiciones de cultivo *in vitro* a partir de yemas de *Nicotiana tabacum* en el sistema de inmersión diseñado.

### 5.2. Recomendaciones

Se recomienda un estudio más profundo en cuanto a todos los parámetros estudiados en los tratamientos 6 y 8, con un rango mayor entre los valores analizados.

Se recomienda probar con otro tipo de plástico para la impresión en 3D de las partes del prototipo que fueron impresas, de preferencia con un plástico que tenga mayor resistencia al calor que el utilizado en el presente estudio (PLA).

Se recomienda un estudio más profundo para determinar la importancia de utilizar una u otra temperatura en el cultivo en SIT de *Nicotiana tabacum*.

Se recomienda realizar la experimentación durante un tiempo más largo, para que se puedan evidenciar más claramente las diferencias entre los parámetros estudiados.

## REFERENCIAS

- Akdemir, H., Süzerer, V., Onay, A., Tilkat, E., Ersali, Y., y Çiftçi, Y. O. (2014). *Micropropagation of the pistachio and its rootstocks by temporary immersion system. Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 117(1), 65-76. Doi: 10.1007/s11240-013-0421-0
- Almansouri, M., Kinet, J.-M., y Lutts, S. (2001). *Effect of salt and osmotic stresses on germination in durum wheat (Triticum durum Desf.)*, *Plant and Soil*, 231(2), 243-254. Doi:10.1023/a:1010378409663
- Alvard, D., Cote, F., y Teisson, C. (1993). *Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation - Effects of temporary immersion of explants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32(1), 55-60. Doi: 10.1007/BF00040116
- Alvarenga, S., y Salazar, T. (2015). Micropropagación masiva de *Stevia rebaudiana Bertoni* en sistemas de inmersión temporal. *Instituto nacional de ciencias agrícolas*, 36 (3), 50-57. Recuperado el 19 abril de 2018 de: [http://www.scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0258-59362015000300008](http://www.scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362015000300008)
- Barahona, E. A. T., Medina, J. X. L., y Díaz, E. T. (2012). Sistema de posicionamiento aplicado a la técnica de impresión 3D modelado por deposición fundida. *Revista De Investigación, Desarrollo E Innovación*, 3(1), 25-32. Recuperado el 20 de diciembre de 2018 de: <https://europepmc.org/abstract/med/28111521>
- Bassail, M., Vega, V. M., Delgado, M. T., Torres, J. L., Pino, A. S., Cabrera, A. R., Ortiz, A. O. (2013). Nueva alternativa para la micropropagación en inmersión temporal del cultivar de plátano vianda "INIVITPV-2011"(AAB). *Revista Colombiana de Biotecnología*. 15(1), 98–107. Recuperado el 1 de mayo de 2018 de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4776393>
- Basail, M., Vega, M., Otero, E., Torres, M., Cabrera, M., López, J., Santos, A., Rayas, A., Bauta, M., Páz, E., Beovidez, Y., Ortega, A., Pérez, J.

- (2011). Multiplicación *in vitro* de 'FHIA-25' (Musa spp., AAB) en Sistemas de Inmersión Temporal. *Biotecnología vegetal*. 11(1), 27-31  
Recuperado el 3 de abril de 2019 de:  
<https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/205/706>
- Basail, M., Vega, V., Gutiérrez, Y., Torres, M., López, J., Santos, A., Rayas, A., Bauta, M., Beovidez, Y., Ortega, A. (2015). Multiplicación *in vitro* de plátano vianda cv. 'INIVIT PV-2011' (Musa AAB) en Sistemas de Inmersión Temporal. *Biología Vegetal*, 15(3), 177-180.  
Recuperado el 3 de febrero de 2018 de:  
<https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/490/html>
- Barretto, S. S., Michoux, F., Hellgardt, K., y Nixon, P. J. (2017). *Pneumatic hydrodynamics influence transplastomic protein yields and biological responses during in vitro shoot regeneration of Nicotiana tabacum callus: Implications for bioprocess routes to plant-made biopharmaceuticals*. *Biochemical Engineering Journal*, 117(1), 73-81.  
Doi: 10.1016/j.bej.2016.10.007
- Beer, S., y Levy, I. (1983). *Effects of photon fluence rate and light spectrum composition on growth, photosynthesis and pigment relations in gracilaria SP.1*. *Journal of Phycology*, 19(4), 516-522.  
Doi:10.1111/j.0022-3646.1983.00516.
- Berchon, M. (2016). *L' impression 3D. Serial makers, 1*. Recuperado el 8 de junio de 2018 de: <https://www.editions-eyrolles.com/Livre/9782212139464/l-impression-3d>
- Berthouly, M., y Etienne, H. (2005). *Temporary immersion system: A new concept for use liquid medium in mass propagation*. *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, 165-195. Doi.org/10.1007/1-4020-3200-5-11.
- Campbell, N., A., y Reece, J., B. (2010). *Biología: Respiración celular, obtención de energía química* (pp. 160-165). Madrid, España: *Editorial Médica Panamericana S.A.*
- Capote, I., Escalona, M., Daquinta, M., Pina, D., González, J., y Aragón, C. (2009). Efecto del análogo de brasinoesteroide (MH5) en la

- aclimatización de los brotes de *Vriesea* propagados en sistemas de inmersión temporal. *Ciencia y Tecnología*, 3, 29-33. Recuperado el 30 de septiembre de 2018 de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4054769>
- Cassells, A. C., y Curry, R. F. (2001). *Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64(2/3), 145-157. Recuperado el 8 de junio de 2018 de: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1010692104861>
- Cavallaro, V., Patanè, C., Cosentino, S. L., Di Silvestro, I., y Copani, V. (2014). *Optimizing in vitro large scale production of giant reed (Arundo donax L.) by liquid medium culture*. *Biomass and Bioenergy*, 69, 21-27. Recuperado el 8 de junio de 2018 de: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.07.004>
- Colmenares, M, y Giménez, C. (2003). Multiplicación *in vitro* *Musa spp.* Mediante sistema de inmersión temporal. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 20(4), 468-477. Recuperado el 8 de junio de 2018 de: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-78182003000400007&lng=es&tylng=es](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182003000400007&lng=es&tylng=es)
- Colodete, C., Fragas, K., De Oliveira, J., Barroso, A., Barros, L. (2015). *Biochemistry characterization of protein defense against oxidative stress in plants and their biosynthetic pathways of secondary metabolites*. *ESFA*, 13(4), 195-204.
- Darko, E., Heydarizadeh, P., Schoefs, B., y Sabzalian, M. R. (2014). *Photosynthesis under artificial light: the shift in primary and secondary metabolism*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1640), 201–203. Recuperado el 15 de marzo de 2018 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24591723>
- Darvishzadeh, R., Mirzaei, L., Maleki, H. H., Laurentin, H., y Alavi, S. R. (2013). *Genetic variation in oriental tobacco (Nicotiana tabacum L.) by agromorphological traits and simple sequence repeat markers*. *Revista Ciencia Agronómica*, 44(2), 347-355. Doi: 66902013000200018

- Ducos, J. P., Terrier, B., Courtois, D., y Pétiard, V. (2008). *Improvement of plastic-based disposable bioreactors for plant science needs. Phytochemistry Reviews*, 7(3), 607–613. Doi: 10.1007/s11101-008-9089-1
- Eriksen M; Mackay J; Schluger N; Gomeshtapeh FI; Drope J, (2015). *The Tobacco Atlas, sixth Edition*, GA, USA: American Cancer Society. Recuperado el 15 de marzo de 2018 de: [https://tobaccoatlas.org/wp-content/uploads/2018/03/TobaccoAtlas\\_6thEdition\\_LoRes\\_Rev0318](https://tobaccoatlas.org/wp-content/uploads/2018/03/TobaccoAtlas_6thEdition_LoRes_Rev0318).
- Escalona, M., Lorenzo, J. C., González, B., Daquinta, M., González, J. L., Desjardins, Y., y Borroto, C. G. (1999). *Pineapple (Ananas comosus L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. Plant Cell Reports*, 18(9), 743-748. Doi.org/10.1007/s002990050653
- Etienne, H., y Berthouly, M. (2002). *Temporary immersion systems for plant microporpagation. Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 69, 215-231. Doi.org/10.1023/A:1015668610465
- Fal, M. A., Majada, J. P., y Sánchez Tamés, R. (2002). *Physical environment in non-ventilated culture vessels affects in vitro growth and morphogenesis of several cultivars of Dianthus Caryophyllus L. In Vitro Cellular y Developmental Biology - Plant*, 38(6), 589-594. Doi.org/10.1079/IVP2002328
- Flores, M. F. C., y Palenius, H. G. N. (2017). Establecimiento Y Micropropagación De Fresa (*Fragaria X Ananassa Duch.*) En un Sistema De Inmersión Temporal (Sit). *Jóvenes En La Ciencia*, 3(2), 85-90. Recuperado el 15 de mayo de 2018 de: <http://www.jovenesenlaciencia.ugto.mx/index.php/jovenesenlaciencia/article/view/1679/1186>
- Frometa, O. M., Gradaille, M. A. D., y Bioplantas, C. De. (2018). *Effect of culture time and culture medium volume per explant on Gerbera jamesonii System*, 16(1), 21-29. Recuperado el 18 de mayo de 2018 de: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20173143976>
- Gaspar, T., Kevers, C., Hausman, J. F., Berthon, J. Y., y Ripetti, V. (1992). *Practical uses of peroxidase activity as a marker of rooting performance*

- of micropropagated shoots. Agronomie, 12, 757-765. Doi./10.1051/agro:19921003*
- Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A., y Bley, T. (2014). *Review Temporary immersion systems in plant biotechnology, (850), 1-47. Doi.org/10.1002/elsc.201300166*
- González, E. J. (2005). *Mass propagation of tropical crops in temporary immersion systems. Liquid Culture Systems for in Vitro Plant Propagation, 197-211. Recuperado el 15 de mayo de 2018 de: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/1-4020-3200-5\\_12](https://link.springer.com/chapter/10.1007/1-4020-3200-5_12)*
- González, J. M., y Gurdíán, W. (1998). Cultivo de Tabaco *Nicotiana Tabacum* L [PDF file]. Escuela agrícola panamericana, departamento de protección vegetal, 285 (40), 3-5. Recuperado el 1 de abril de 2018 de: [https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/2495/1/cultivo de tabaco.pdf](https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/2495/1/cultivo_de_tabaco.pdf)
- Hand, M. L., de Vries, S., y Koltunow, A. M. G. (2016). *Bioreactors for Plant Embryogenesis and Beyond. In Vitro Embryogenesis in Higher Plants ethods in Molecular Biology 1359 (23), 245–255. Doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6\_1*
- Harris RE y Mason EBB (1983) *Two machines for in vitro propagation of plants in liquid media. Can. J. Plant (63) 311-316 Doi.org/10.4141/cjps83-032*
- Heckele, M., y Schomburg, W. K. (2004). *Review on micro molding of thermoplastic polymers. Journal of Micromechanics and Microengineering, 14(3) 25-28. Doi.org/10.1088/0960-1317/14/3/R01*
- Hilae, A., y Te-chato, S. (2005). *Effects of carbon sources and strength of MS medium on germination of somatic embryos of oil palm (Elaeis quineensis Jacq.). Songklanakarin J. Sci. Technol, 27(3), 629–635. Doi.org/10.1175/1520-0493(1991)119<0518:TUATDO>2.0.CO;2*
- Hvoslef-Eide, A., y Preil, W. (2005). *Liquid culture systems for in vitro plant propagation 20(2), 529–535. Doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004*
- Imada, C. (2012). *Hawaiian Native and Naturalized Vascular Plants Checklist [PDF file]. Honolulu, Hawái. Bishop Museum's Hawaii Biological*

- Survey. Recuperado el 1 de abril de 2018 de:  
<http://hbs.bishopmuseum.org/publications/pdf/tr60.pdf>
- Insht, (2018), Factores de reflexión de diversos colores [archivo PDF].  
Recuperado el 12 de abril de 2018 de:  
<http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/GuiasMonitor/Ergonomia/V/Ficheros/ev25.pdf>
- Ji, T., Li, S., Li, L., Huang, M., Wang, X., Wei, M., Yang, F. (2018). *Cucumber Phospholipase D alpha gene overexpression in tobacco enhanced drought stress tolerance by regulating stomatal closure and lipid peroxidation. BMC Plant Biology*, 18(1). Doi: 10.1186/s12870-018-1592-y
- Jova, M. C., Kosky, R. G., Pérez, M. B., Pino, A. S., Vega, V. M., Torres, J. L., DeVentura, J. L. C. (2005). *Production of yam microtubers using a temporary immersion system. Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 83(1), 103–107. Doi.org/10.1007/s11240-005-4853-z
- Jurecková, J. F., Sykorova, E., Hafidh, S., Honys, D., Fajkus, J., y Fojtová, M. (2016). *Tissue-specific expression of telomerase reverse transcriptase gene variants in Nicotiana tabacum. Planta*, 245(3), 549–561. Doi: 10.1007/s00425-016-2624-1
- Karen E. Koch, V. W. and J. X. (1996). *Sugar and metabolic regulation of genes for sucrose metabolism: potential influence of maize sucrose synthase and soluble invertase responses on carbon partitioning and sugar sensing. Journal Of Experimental Botany*, 47(1229), 1179–1185.  
Recuperado el 25 de agosto de 2018 de:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21245246>
- Koch, K. E. (1996). *Carbohydrate-Modulated Gene Expression in Plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47(1), 509–540. Doi: 47.1.509
- Kumawat, T. K., Sharma, A., y Bhadauria, S. (2016). *Influence of liquid culture media, temperature and hydrogen ion concentration on the growth of mycelium and sporulation of arthroderma multifidum. International Journal of Pharmaceutical, Sciences Review and Research*, 41(2),

136–141. Recuperado el 22 de abril de 2018 de: [https://www.researchgate.net/profile/Tarun\\_Kumar\\_Kumawat/publication/312033840\\_Influence\\_of\\_Liquid\\_Culture\\_Media\\_Temperature\\_and\\_Hydrogen\\_Ion\\_Concentration\\_on\\_the\\_Growth\\_of\\_Mycelium\\_and\\_Sporulation\\_of\\_Arthroderma\\_multifidum/links/59004039a6fdcc8ed50de08f/Influence-of-Liquid-Culture-Media-Temperature-and-Hydrogen-Ion-Concentration-on-the-Growth-of-Mycelium-and-Sporulation-of-Arthroderma-multifidum.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Tarun_Kumar_Kumawat/publication/312033840_Influence_of_Liquid_Culture_Media_Temperature_and_Hydrogen_Ion_Concentration_on_the_Growth_of_Mycelium_and_Sporulation_of_Arthroderma_multifidum/links/59004039a6fdcc8ed50de08f/Influence-of-Liquid-Culture-Media-Temperature-and-Hydrogen-Ion-Concentration-on-the-Growth-of-Mycelium-and-Sporulation-of-Arthroderma-multifidum.pdf)

Levchik, S. V., y Weil, E. D. (2005). *Flame retardancy of thermoplastic polyester - A review of the recent literature. Polymer International*, 54(1), 11-35.

Recuperado el 25 de mayo de 2018 de: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pi.1663>

López, A., García, E., Martínez, J., y Molina, S. (2018). Estudio de fractura de estructuras reticulares de termoplásticos fabricadas mediante modelado por deposición fundida. *UCA*. 35, 611-615. Recuperado el 28 de mayo de 2018 de: <http://imprimalia3d.com/recursosimpresion3d/estudio-fractura-estructuras-reticulares-termopl-asticos-fabricadas-mediante>

Lorenzo, J. C., González, B. L., Escalona, M., Teisson, C., Espinosa, P., y Borroto, C. (1998). *Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 54(3), 197-200. Recuperado el 25 de mayo de 2019 de <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1006168700556>

Loyola, V., Ochoa. (2016). *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications. Springer International Publishing* 5(3), 100-140. Doi: 9783319337043

McAlister, B., Finnie, J., Watt, M. P., y Blakeway, F. (2005). *Use of the temporary immersion bioreactor system (RITA®) for production of commercial Eucalyptus clones in Mondi Forests (SA). Liquid Culture Systems for in Vitro Plant Propagation*, 81(3) 425-442. Recuperado el 28 de mayo de 2018 de: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11240-004-6658-x>

- Mordocco, A. M., Brumbley, J. A., y Lakshmanan, P. (2009). *Development of a temporary immersion system (RITA®) for mass production of sugarcane (Saccharum spp. interspecific hybrids)*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 45(4), 450-457. Recuperado el 28 de diciembre de 2018 de: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11627-008-9173-7>
- Mosqueda, O., Escalona, M. M., Teixeira, J. A., Pina, D. T., y Daquinta, M. A. (2017). *In vitro propagation of Gerbera jamesonii Bolus ex Hooker f. in a temporary immersion bioreactor*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 129(3), 543-551. Recuperado el 22 de diciembre de 2018 de: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11240-017-1186-7>
- Novakova, L., y Kuric, I. (2012). *Basic and Advanced Materials for Fused Deposition Modeling*. *Rapid Prototyping Technology*, 11(1), 24–27. Recuperado el 24 de abril de 2018 de: <https://pdfs.semanticscholar.org/1ecc/fa155a85a8d399c875984a5e4c2d004a547c>.
- Palomares, M., Vidales, I., Guillén, H., y Salgado, R. (2003). Influencia de espacios de crecimiento, temperaturas e intensidades de luz en la conservación in vitro de germoplasma de aguacate. *Proceedings V World Avocado Congress*, 103-109. Recuperado el 2 de enero de 2019 de: [http://www.avocadosource.com/WAC7/Section\\_14/VidalesFernandezI2011b](http://www.avocadosource.com/WAC7/Section_14/VidalesFernandezI2011b)
- Pantaleoni, L., Longoni, P., Ferroni, L., Baldisserotto, C., Leelavathi, S., Siva Reddy, V., Cella, R. (2013). *Chloroplast molecular farming: Efficient production of a thermostable xylanase by Nicotiana tabacum plants and long-term conservation of the recombinant enzyme*. *Protoplasma*, 251(3), 639–648. Doi: 10.1007/s00709-013-0564-1
- Pearce, J. M. (2015). *Applications of Open Source 3-D Printing on Small Farms*. *Organic Farming*, 1(1), 19–35. Recuperado el 28 de mayo de 2018 de: [https://digitalcommons.mtu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1019&context=materials\\_fp](https://digitalcommons.mtu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1019&context=materials_fp)

- Peña, J., Azpeitia, A., Mirafuentes, F., Ruiz, V., Saenz, L. (2016). Incremento de embriones somáticos de cacao (*Theobroma cacao* L.) en sistema de inmersión automático. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 3(8) 215-224. Recuperado el 3 de enero de 2019 de: <http://www.scielo.org.mx/pdf/era/v3n8/2007-901X-era-3-08-00215.pdf>
- Pérez, R. (2015). Las 4 tecnologías de impresión 3D más populares del mercado. Panamá: TECNOIMPRES 3D. Venezuela: Tecnoimpres3D. Recuperado el 5 de enero de 2019 de: <http://tecnoimpres3d.com/tecnologia/4-tecnologias/>
- Pérez, N., Capote, A., Pérez, A., Gerth, A., Chong-Pérez, B., y Jiménez, E. (2015). Efecto de la densidad de inóculo y la renovación de la atmósfera gaseosa en el cultivo de brotes de *Digitalis purpurea* L. en Sistemas de Inmersión Temporal. *Biotecnología Vegetal*, 15(1), 35-45. Recuperado el 8 de septiembre de 2018 de: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/11/488>
- Pierik, R. (1990). Cultivo *in vitro* de las plantas superiores (200 - 231). Barcelona, España: S.A. Mundi-prensa libros.
- Ponmurugan, P., Kumar Suresh K. (2012). *Applications of Plant Tissue Culture (pp. 31-42)*. Daryaganj, India: Ed. New Age International. Recuperado el 7 de enero de 2018 de: <https://ebookcentral.proquest.com>
- Ramos, A., Iglesias, L. G., Bello, J., y Lee, H. (2014). Improved propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*. 50(5), 576–581. Recuperado el 20 de septiembre de 2018 de: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11627-014-9602-8>
- Ratkovich, N., Zuluaga, L., Naranjo, L., Svojitka, J., Wintgens, T., y Rodriguez, M. (2015). Simulación en CFD de un BioReactor de Membrana Anaeróbico para tratamiento de aguas residuales industriales. *Revista de Ingeniería*, 0(42), 23. Doi:10.16924/riua.v0i42.702
- Rice, J. H., Mundell, R. E., Millwood, R. J., Chambers, O. D., Stewart, C. N., y Davies, H. M. (2013). *Assessing the bioconfinement potential of a*

- Nicotiana hybrid platform for use in plant molecular farming applications. BMC Biotechnology. 13(1), 13-63. Doi: 23914736*
- Robert, M. L., Herrera, J. L., Herrera, G., Herrera, M. A., y Fuentes, P. (2006). *A New Temporary Immersion Bioreactor System for Micropropagation. Plant Cell Culture. 318, p.121-129. Doi: 10.1385/1-59259-959-1:121*
- Rodríguez, E. (2018). Impresión 3D, una introducción. UNAM. Recuperado el 5 de junio de 2018 de: [http://olimpia.cuautitlan2.unam.mx/pagina\\_ingenieria/mecanica/mat/mat\\_mec/m9/IMPRESION%203D\\_UNA%20INTRODUCCION.pdf](http://olimpia.cuautitlan2.unam.mx/pagina_ingenieria/mecanica/mat/mat_mec/m9/IMPRESION%203D_UNA%20INTRODUCCION.pdf)
- Ross, S. y Castillo, A. (2010). Micropropagación de *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. en medios de cultivo líquidos. *Agrociencia. 14(1)*. Recuperado el 28 de diciembre de 2018 de: [https://www.researchgate.net/publication/301638036\\_Micropropagacion\\_de\\_Achyrocline\\_flaccida\\_Weinm\\_DC\\_en\\_medios\\_de\\_cultivo\\_liquidos](https://www.researchgate.net/publication/301638036_Micropropagacion_de_Achyrocline_flaccida_Weinm_DC_en_medios_de_cultivo_liquidos)
- Santos, A., Cabrera, M., Gómez, R., López, J., Rayas, A., Basail, M., Medero, V., y Beovides, Y. (2011). Multiplicación en sistema de inmersión temporal del clon de malanga "Viequera" (*Xanthosoma spp.*). *Revista colombiana de biotecnología, 13(2), 97-106*. Recuperado el 2 de enero de 2019 de: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/27954/38325>
- Scherer, R. F., Garcia, A. C., Fraga, H. P. de F., Vesco, L. L. D., Steinmacher, D. A., y Guerra, M. P. (2013). *Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (Ananas comosus var. comosus)*. *Scientia Horticulturae, 151, 38-45*. Recuperado el 13 de julio de 2018 de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423812005560>
- Shang, S. Z., Xu, W. X., Lei, P., Zhao, W., Tang, J. G., Miao, M. M., Yang, G. Y. (2014). *Biphenyls from Nicotiana tabacum and their anti-tobacco mosaic virus*. *Fitoterapia, 99, 35-39*. Recuperado el 14 de julio de 2018 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25128901>

- Sheen, J. (1990). *Metabolic Repression of Transcription in Higher Plants*. *The plant cell*, 2(10), 1027-1038. Recuperado el 15 de junio de 2018 de: [www.plantcell.org/content/2/10/1027](http://www.plantcell.org/content/2/10/1027)
- Sluis, C. J. (2008). *Integrating Automation Technologies with Commercial Micropropagation*. *Plant Tissue Culture Engineering*, p.231-251. Recuperado el 11 de mayo de 2018 de: [https://link.springer.com/.../10.1007%2F978-1-4020-3694-1\\_13](https://link.springer.com/.../10.1007%2F978-1-4020-3694-1_13)
- Snyman, S. J., Meyer, G. M., Koch, A. C., Banasiak, M., y Watt, M. P. (2011). Applications of in vitro culture systems for commercial sugarcane production and improvement. *In Vitro Cellular y Developmental Biology - Plant*, 47(2), 234–249. Doi: 10.1007/s11627-011-9354-7
- Steingroewer, J., Bley, T., Georgiev, V., Ivanov, I., Lenk, F., Marchev, A., y Pavlov, A. (2013). *Bioprocessing of differentiated plant in vitro systems*. *Engineering in Life Sciences*, 13(1), 26-38. Doi: 10.1002/elsc.201100226
- Teisson, C., y Alvard, D. (1995). *A New Concept of Plant in Vitro Cultivation Liquid Medium: Temporary Immersion*. *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, 105-110. Doi: 10.1007/978-94-011-0307-7\_12
- Tremblay, R., Wang, D., Jevnikar, A. M., y Ma, S. (2010). *Tobacco, a highly efficient green bioreactor for production of therapeutic proteins*. *Biotechnology Advances*, 28(2), 214–221. Recuperado el 11 de mayo de 2018 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19961918>
- Vicente Oliva, S. (2018). La impresión 3D como tecnología de uso general en el futuro. *Economía Industrial*, 123-135. Recuperado el 19 de diciembre de 2019 de: [https://www.researchgate.net/publication/325264651\\_La\\_impresion\\_3D\\_como\\_tecnologia\\_de\\_uso\\_general\\_en\\_el\\_futuro\\_Economia\\_Industrial\\_num\\_407\\_Pp\\_123-135](https://www.researchgate.net/publication/325264651_La_impresion_3D_como_tecnologia_de_uso_general_en_el_futuro_Economia_Industrial_num_407_Pp_123-135)
- Wang, F., Qiu, N., Ding, Q., Li, J., Zhang, Y., Li, H., y Gao, J. (2014). *Genome-wide identification and analysis of the growth-regulating factor family in Chinese cabbage (Brassica rapa L. ssp. pekinensis)*. *Gene*, 639, 1-12.

- Recuperado el 11 de diciembre de 2019 de:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25242257>
- Welander, M., Persson, J., Asp, H., y Zhu, L. H. (2014). *Evaluation of a new vessel system based on temporary immersion system for micropropagation. Scientia Horticulturae*, 179, 227-232. Retrieved from  
Recuperado el 19 de julio de 2018 de:  
<https://www.sciencedirect.com/science/.../S0304423814005135>
- Xiao, B., Tan, Y., Long, N., Chen, X., Tong, Z., Dong, Y., y Li, Y. (2015). *SNP-based genetic linkage map of tobacco (Nicotiana tabacum L.) using next-generation RAD sequencing. Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 22(1), 11. Recuperado el 13 de junio de 2018 de:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4607152/>
- Yaseen, M., Ahmed, T., Akhtar, N., y Ahmed, I. (2009). *In vitro shoot proliferation competence of apple rootstocks M. 9 and M. 26 on different carbon. Pakistan Journal of Botany*, 41(4), p.1781-1795. Recuperado el 20 de diciembre de 2019 de:  
[http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/41\(4\)/PJB41\(4\)1781.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/41(4)/PJB41(4)1781.pdf)
- Yaseen, M., Ahmed, T., Sablok, G., Standardi, A., y Hafiz, I. A. (2013). *Review: role of carbon sources for in vitro plant growth and development. Molecular Biology Reports*, 40(4), 2837-2849. Recuperado el 20 de diciembre de 2019 de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23212616>
- Yuan, L., Huang, W., Zhang, C., Xiang, N., Liu, C., Yang, G., Ma, Y. (2015). *Antiviral flavones from the leaves of Nicotiana tabacum. Phytochemistry Letters*, 12, p.75-78. Recuperado el 17 de julio de 2018 de:  
<https://www.sciencedirect.com/science/.../S1874390015000245>
- Ziv, M. (2005). *Simple bioreactors for mass propagation of plants. Liquid Culture Systems for in Vitro Plant Propagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 81(3), 79-93. Doi: 10.1007/s11240-004-6649-y
- Ziv, M., y Ariel, T. (1992). *On the relation between vitrification and stomatal cell wall deformity in carnation leaves in vitro. Acta Horticulturae*, (314), 121-130. Recuperado el 15 de julio de 2018 de:  
<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=NL9301553>

