



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

DISEÑO Y DESARROLLO DE UN SISTEMA DE INMERSIÓN
TEMPORAL SEMI-AUTOMATIZADO DESTINADO A LA
MICROPROPAGACIÓN MASAL DE ESPECIES VEGETALES

AUTORES

Camilo Alberto Calvache Román

Jacqueline Belén Freire Alarcón

AÑO

2019



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

DISEÑO Y DESARROLLO DE UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL
SEMI-AUTOMATIZADO DESTINADO A LA MICROPROPAGACIÓN MASAL
DE ESPECIES VEGETALES

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

Profesor guía

M.Sc. Fernando Xavier Rivas Romero

Autores

Camilo Alberto Calvache Román

Jacqueline Belén Freire Alarcón

Año

2019

DECLARACIÓN DEL DOCENTE GUÍA

“Declaro haber dirigido el trabajo Diseño y desarrollo de un sistema de inmersión temporal semi-automatizado destinado a la micropropagación masal de especies vegetales, a través de reuniones periódicas con los estudiantes Camilo Alberto Calvache Román y Jacqueline Belén Freire Alarcón, 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 Universitario en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas

CI: 171809270-1

DECLARACIÓN DEL DOCENTE CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, Diseño y desarrollo de un sistema de inmersión temporal semi-automatizado destinado a la micropropagación masal de especies vegetales, de los estudiantes Camilo Alberto Calvache Román y Jacqueline Belén Freire Alarcón en el semestre 201910, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

María Alejandra Cruz Salazar

Máster en Ingeniería de Bioprocesos y Biotecnología

CI: 171992857-2

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaramos que este 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.”

Camilo Alberto Calvache Román

CI: 172373216-8

Jacqueline Belén Freire Alarcón

CI: 171734348-5

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de las Américas por las herramientas necesarias para mi formación profesional.

Al M. Sc. Fernando Rivas por su tiempo y enseñanzas a lo largo del proceso.

A la Unidad de Innovación Tecnológica (UITEC), especialmente a Santiago Solórzano por su asesoramiento y tiempo.

Al Ing. Omar por su esfuerzo y enseñanzas.

A mi familia por su apoyo y amor incondicional durante el proceso. A Dios, por hacer que todo el trabajo haya sido posible.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres y hermanas, por su apoyo incondicional y por siempre haber creído en mí.

Dedico este trabajo a aquellas personas que luchan por lo que merecen.

Finalmente, a mi novio y compañero en esta travesía, Camilo, gracias por todo tu apoyo a lo largo de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de las Américas por haberme brindado los conocimientos y el personal para el desarrollo de este trabajo de titulación.

Al M. Sc. Fernando Rivas por su forma de enseñanza y empeño en el proceso de construcción de este trabajo.

A la Unidad de Innovación Tecnológica (UITEC), especialmente a Santiago Solórzano por su asesoramiento y tiempo.

Al Ing. Omar Flor por su esfuerzo, enseñanzas y pasión por la realización de este trabajo.

A mi familia por su apoyo y guía durante la realización de este.

Al Padre Celestial, por haberme otorgado todas las capacidades para realizar este trabajo.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi familia, ya que ellos me han apoyado desde que era pequeño en todas las metas que me he propuesto.

Dedico este trabajo a mi novia y compañera de esta travesía Jacqueline por haberme dado la oportunidad para cambiar el mundo de la biotecnología vegetal.

Dedico este trabajo a Steve Jobs por ser mi más grande inspiración y por haberme inculcado la búsqueda de la perfección y simplicidad en el diseño, a

RESUMEN

En 1983, Harris y Mason describieron un sistema de máquinas basculantes al que denominaron "*auxophyton*". A partir del trabajo de estos autores, se han desarrollado una amplia gama de sistemas semi-automatizados, que cumplen con una inmersión constante, transferencia ideal de oxígeno, cambios frecuentes del medio de cultivo, reducción del riesgo de contaminación y minimización de los costos de producción, a los cuales se los denomina sistemas de inmersión temporal (SIT), generados como respuesta frente a los problemas de los métodos convencionales de cultivo *in vitro*. Sin embargo, a pesar de que los SITs desarrollados hasta la fecha han permitido solucionar varios de estos problemas, cada uno posee desventajas que hacen necesario el desarrollo de un SIT que permita mejorar los resultados, a fin de obtener plantas de calidad. Así, en el presente estudio se analiza y compara la multiplicación axilar de *Nicotiana tabacum*, una especie vegetal modelo del cultivo *in vitro*, en un nuevo sistema de inmersión temporal, frente al cultivo en medio semisólido. Los tratamientos comprenden a un sistema de inmersión temporal con medio basal MS, otro con medio basal MS suministrado con 6-N-Bencilaminopurina (6-BAP, 2 mg/L) y Ácido 1-naftalenacético (ANA, 0,2 mg/L) y los sistemas semisólidos, que incluyen medio basal MS y otro, con medio basal MS suministrado con 6-BAP (2 mg/L) y ANA (0,2mg/L). Los resultados demostraron que existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos en los sistemas de inmersión temporal frente a los medios semisólidos, tanto para los medios basales sin fitohormonas, como para los medios basales con fitohormonas, demostrando que el sistema desarrollado permite la obtención de mejores resultados que en los medios semisólidos, tanto en el número de brotes ($14 \pm 1,05$ brotes), número de hojas ($10 \pm 0,82$ hojas), longitud de las hojas ($1,94 \pm 0,23$ cm) y tasa de multiplicación ($0,81 \pm 0,06$ brotes/día). Por tanto, este estudio representa un punto de partida para la evaluación y optimización de este sistema a futuro.

ABSTRACT

In 1983, Harris and Mason described a tilting machines system, that they called "*auxophyton*". From the work of these authors, a wide range of semi-automated systems have been developed, which comply with a constant immersion, ideal oxygen transfer, frequent culture medium changes, contamination risk reduction and production costs minimization, which are called temporary immersion systems (TIS), generated in response to the problems of *in vitro* culture conventional methods. However, despite the fact that the TISs developed to date have allowed to solve several of these problems, each one has disadvantages that make it necessary to develop a TIS that allows to improve results, in order to obtain quality plants. Thus, in this study we analyze and compare *Nicotiana tabacum* axillary multiplication, an *in vitro* culture plant species model, in a new temporary immersion system, compared to semi-solid medium culture. Treatments include a temporary immersion system with MS basal medium, another with MS basal medium supplied with 6-Benzylaminopurine (6-BAP, 2 mg / L) and 1-Naphthaleneacetic acid (NAA, 0.2 mg / L) and semisolid systems, which include basal MS medium and another, with MS basal medium supplied with 6-BAP (2 mg / L) and NAA (0.2mg / L). The results showed that there are significant differences between the results obtained in the TIS versus the semi-solid medium, both for the basal media without phytohormones, and for the basal media with phytohormones. Demonstrating that the system developed allows obtaining better results than in semi-solid medium, both in the shoots number ($14 \pm 1,05$ shoots), leaves number ($10 \pm 0,82$ leaves), leaves length ($1,94 \pm 0,23$ cm) and multiplication rate (0.81 ± 0.06 shoots / day). Therefore, this study represents a starting point for the evaluation and optimization of this system in the future.

ÍNDICE

1. Capítulo I. Introducción	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Planteamiento del problema	5
1.3. Justificación	6
1.4. Objetivos	8
1.4.1. Objetivo general	8
1.4.2. Objetivos específicos	8
2. Capítulo II. Marco teórico	9
2.1 Utilización de modelos vegetales en el desarrollo de la biotecnología vegetal	9
2.2 Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	10
2.2.1. Estudios en cultivos <i>in vitro</i>	12
2.2.2. Estudios en cultivos de polen y anteras	14
2.2.3. Estudios en Variación genética y Selección de mutantes	16
2.2.4. Estudios en Aislamiento, Cultivo y Fusión de protoplastos	18
2.2.5. Estudios en Biotransformación y Producción de metabolitos secundarios	19
2.2.6. Estudios en Transgénesis y Aplicaciones	21
2.2.7. Estudios en <i>Molecular Farming</i>	24
2.3. Sistemas de Inmersión Temporal (SIT)	27
2.3.1. Sistemas con máquinas basculantes	28
2.3.2. Sistemas con inmersión completa y mecanismo de renovación de medio líquido	28
2.3.3. Sistemas con inmersión parcial y mecanismo de renovación de medio líquido	30
2.3.4. Sistemas con inmersión completa por transferencia neumática de medio líquido y sin reposición del medio	32
2.3.4.1. El Sistema <i>RITA</i>	32
2.3.4.2. Sistema de frascos gemelos (<i>BIT</i>)	34
2.3.5. SITs Varios	37
2.3.5.1. Thermo-foto-biorreactor SIT	37
2.3.5.2. Sistema de flujo híbrido-convectivo tubular saturado	38

2.3.5.3.	Biorreactor De Inmersión Por Burbujas (BIB).....	40
2.3.5.4.	Sistemas de Balancín	41
2.3.5.5.	Sistema giratorio del tambor	43
2.3.6	SITs desechables y de bajo costo	44
2.4.	Diseño y construcción de Sistemas de Inmersión Temporal (SIT)	46
3.	Capítulo III. Metodología	48
3.1.	Diseño y construcción del SIT propuesto	48
3.1.1.	Diseño	48
3.1.2.	Construcción	48
3.2.	Validación del SIT propuesto	48
3.2.1.	Obtención del material de partida	48
3.2.2.	Diseño experimental	49
3.3.	Evaluación estadística de los resultados	50
3.4.	Diagrama de flujo del proceso	50
4.	Capítulo IV. Resultados y discusión	51
4.1	Validación del SIT propuesto	51
5.	Conclusiones y recomendaciones	63
5.1.	Conclusiones	63
5.2.	Recomendaciones	64
	Referencias	65

1. Capítulo I. Introducción

1.1. Antecedentes

La micropropagación vegetal es un proceso integrado en el que se aíslan células, tejidos u órganos vegetales, esterilizando su superficie o no, e incubándolos asépticamente a fin de promover el crecimiento para la producción masiva de clones de plantas (Altman & Loberant, 2003). Las técnicas de clonación de células vegetales aisladas *in vitro*, demostró que las células somáticas, bajo condiciones determinadas, pueden dar lugar a una planta entera. Este potencial es denominado totipotencia celular, el cual consiste en que las células o tejidos son capaces de formar todos los tipos de células y regenerar individuos, principio aprovechado para el cultivo de tejidos (Kumar & Reddy, 2011).

El cultivo *in vitro*, concepto introducido por Guttenberg (1943), es una de las herramientas clave de la biotecnología vegetal, ya que explota la totipotencia vegetal. Fue demostrado por primera vez, inequívocamente, por Steward *et al.* (1958). Así, el cultivo vegetal es denominado alternativamente como cultivo de células, tejidos y órganos mediante condiciones *in vitro* (Debergh & Read, 1991). Este puede ser empleado en la propagación masiva de clones libres de enfermedades y para la conservación del acervo genético. Actualmente, la industria aplica extensamente el enfoque de propagación para la producción masiva de variedades élite, dando como resultado, la inclusión de cientos de laboratorios destinados al cultivo de tejidos vegetales a nivel mundial, especialmente en países en vías de desarrollo, gracias al abaratamiento de los costos de trabajo (Kumar & Reddy, 2011).

Los cultivos de tejidos diferenciados (embriones, raíces transformadas, entre otros), desarrollados a gran escala, se podían realizar al cultivar los tejidos *in vitro* en medios líquidos, en condiciones ambientales controladas, empleando sistemas de biorreactores. El objetivo principal de este enfoque es lograr una producción económicamente viable de grandes cantidades de biomasa vegetal,

lista para su directa aplicación o para un posterior aislamiento de productos de interés (Georgiev, Schumann, Pavlov & Bley, 2014).

En 1983, Harris & Mason describieron el diseño de un sistema de máquinas basculantes llamado *auxophyton*, empleadas para lograr la inmersión temporal del material vegetal, mediante la combinación de aireación y el cultivo con medio líquido. Basándose en que (Steward *et al.*,1952) habían observado que los explantes de raíz de zanahoria, cultivados en medio líquido no crecieron rápidamente, dedujeron que esto estaba relacionado a la carencia de oxígeno. El *auxophyton* daba la vuelta a recipientes de cultivo en una rueda, lo cual permitía alternar entre períodos de aireación y sumersión de los explantes.

A partir de la publicación realizada por Harris & Mason (1983) se han desarrollado varios Sistemas de Inmersión Temporal (SITs), que varían en sus características de diseño y especificaciones:

Tisserat & Vandercook (1985) diseñaron al sistema Automatizado de Cultivo de Plantas (APCS) que incluía una cámara de cultivo suspendida, la cual era drenada constantemente y posteriormente rellena con medio de cultivo fresco, proporcionando un método para el cultivo *in vitro* a largo plazo.

Aitken-Christie & Jones (1987) y Aitken-Christie & Davies (1998) diseñaron un sistema semiautomático de envases de policarbonato, en el que se empleaba el cultivo de agar, mediante la adición y evacuación automática del medio de cultivo mediante bombas al vacío.

Simonton, Robacker, & Krueger (1991) un sistema donde el material vegetal está suspendido en una base de polipropileno, a la cual se bombeaba medio líquido, acción controlada por computadora, junto con la regulación del nivel de profundidad por recipiente, ciclos horarios, entre otros.

El sistema *Récepteur Immersion Temporaire Automatique* (RITA) desarrollado por Teisson & Alvard (1995) comprende un único recipiente de polipropileno, sellado con dos compartimentos separados por una bandeja porosa ubicada en el centro. El compartimento superior actúa como cámara de cultivo, a la cual es bombeada por aire a presión, el medio de cultivo ubicado en la cámara inferior.

El sistema de frascos gemelos o Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT), diseñado por Escalona *et al.* (1998) comprende dos envases interconectados. Uno de los envases actúa como cámara de cultivo al cual se bombea, mediante aire presurizado, el medio de cultivo ubicado en el otro envase.

Navarro *et al.* (2013) diseñaron el *Thermo-foto-biorreactor SIT*, el cual consiste de dos recipientes de cristal conectados por tubos de acero inoxidable. El recipiente superior actúa como cámara de cultivo, equipada con una chaqueta de agua para el control de la temperatura, junto con una fuente de luz ultravioleta. Por otro lado, el compartimento inferior actúa como el tanque de almacenamiento para el medio de cultivo.

El sistema *Ebb-and-Flow* con flujo convectivo tubular saturado, diseñado por Cuello & C Yue (2008) consta de un sistema híbrido, que comprende una fase de columna de burbujas en los días posteriores a la inoculación y después, actúa como un sistema de frascos gemelos.

El biorreactor de Inmersión por Burbujas o *Biorreactor de Imersão por Bolhas* (BIB) diseñado por Scheidt *et al.* (2011) consta de una estructura cilíndrica dividida transversalmente por compartimentos microporosos, los cuales sitúan a la cámara de cultivo en la parte superior. El medio de cultivo se encuentra en el compartimento inferior, y el mismo se encuentra equipado con detergente, haciendo que el medio suba hacia la cámara de cultivo en forma de espuma.

Los sistemas de balancín emplean plataformas mecánicas a fin de inclinar las placas de cultivo en un ángulo determinado, de tal forma de que el medio pueda

ser distribuido desde un punto del envase del cultivo al otro. Algunos de los sistemas han sido descritos por Adelberg & Toler (2004); Kämäräinen-Karppinen, Virtanen, Rokka & Pirttilä (2010); Uchendu, Paliyath, Brown & Saxena (2011).

El sistema giratorio de tambor desarrollado por Akita & Ohta (1998) comprende un sistema de rodillos junto con una botella de vidrio, en la cual se encuentra una colchoneta de poliuretano, la cual permite la sumersión y aireación de los explantes en la medida en la que estos giran por los rodillos.

Finalmente, los SITs desechables y de bajo costo se diseñaron con la finalidad de reducir los costos de inversión destinados al equipamiento, por lo que generalmente se los fabrica con elementos plásticos desechables. Algunas variantes son: Biorreactores RALM, el sistema SETIS, el sistema PLANTIMA, entre otros (Georgiev et al., 2014).

Por otro lado, sabemos que los avances en biotecnología vegetal han generado un gran impacto en el área de cultivo *in vitro*, manipulación genética, entre otros. (Basra, 1994; Chopra & Malik, 2000; Ganapathi, Suprasanna, Rao & Bapat, 2004; Ghosh, 1999; Soh & Bhojwani, 1999) cabe recalcar que la gran mayoría de descubrimientos en el campo vegetal a diferentes niveles se han generado a partir de la realización de ensayos llevados a cabo en plantas de *Nicotiana tabacum*, razón por la cual esta especie se ha convertido en el sistema modelo más empleado en el campo de la biotecnología vegetal (Basra, 1994; Sharp, Evans, Ammirato & Yamada, 1984).

El trabajo con tabaco se ha realizado gracias a su plasticidad genética, facilidad de regenerar clones rápidamente e información disponible, por lo que se ha vuelto la especie vegetal más empleada para estudios en: cultivo *in vitro*, cultivo de polen y anteras, variación genética y selección de mutantes, aislamiento, cultivo y fusión de protoplastos, biotransformación y producción de metabolitos

secundarios, transgénesis y *Molecular Farming* (Ganapathi, Suprasanna, Rao & Bapat, 2004).

1.2. Planteamiento del problema

El cultivo *in vitro* de células vegetales, llamado también como micropropagación vegetal, es realizado generalmente en medios con agentes gelificantes. A pesar de su continuo uso, poseen algunos inconvenientes como: condiciones de cultivo heterogéneas, ya que el explante no se encuentra completamente en contacto con el medio nutriente y es necesario realizar subcultivo cada determinado tiempo ya que se agotan los nutrientes del medio. Por lo que, el proceso de micropropagación es intensivo en mano de obra, lo cual aumenta los costos de producción de las plantas producidas *in vitro*, además, de que existe mayor probabilidad de error en la manipulación de las plantas ocasionando pérdidas en la producción (Robert *et al.*, 2006).

Para la optimización del proceso y que se halle disponible para la mayoría de especies vegetales, se han desarrollado métodos sencillos y baratos de micropropagación que puedan disminuir la cantidad de trabajo y costos de producción, entre ellos se destaca la utilización de medios líquidos (Gross & Levin, 1998). Los medios líquidos han logrado tener un mejor rendimiento ya que, según Murashige & Skoog, (1962), se concluyó que el crecimiento puede ser limitado por la cantidad de agua en la formulación de sales basales. De igual manera en el estudio Adelberg (2016), se confirmó aquella afirmación y concluyeron que la limitación de agua puede ocasionar que los nutrientes ya no estén disponibles, lo cual se soluciona con los medios líquidos ya que la disponibilidad de agua es mayor que en medios semi-sólidos.

Los medios líquidos permiten métodos innovadores en la automatización de micropropagación vegetal (Adelberg, 2004). Entre ellos, se destaca los sistemas de inmersión temporal (SIT), los cuales han sido diseñados para incrementar el crecimiento vigoroso de plantas al tiempo que aumentan la eficiencia del trabajo y el espacio de laboratorio (Etienne & Berthouly, 2002).

Los SIT que han sido ampliamente utilizados son el Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado (RITA), el sistema de inmersión temporal de frascos gemelos (BIT), sistema flujo y reflujo, BioMint, tambor giratorio, RALM, SETIS, PLANTIMA, PLANTFORM, WAVE, entre otros. A pesar de que brindan varias ventajas, poseen distintos inconvenientes que aún deben ser solucionados, como la incapacidad de renovación del medio y no son aptos para ventilación y enriquecimiento de CO₂ como es en el caso del RITA y BIT. Por otro lado, en el sistema flujo y reflujo y BIOMINT requieren de mayor espacio en la cámara de incubación por su estructura compleja. En el caso del tambor giratorio, no hay la completa separación de los explantes con el medio, no hay control sobre los tiempos de inmersión, no existe renovación del medio y ocupa gran cantidad de espacio. Cabe resaltar, que el sistema WAVE posee un monitoreo totalmente automatizado y preciso de pH, de oxígeno disuelto, CO₂ y temperatura, ocasionando la necesidad de más SIT con dispositivos encargados del control y monitoreo de los parámetros del medio de cultivo (Georgiev *et al.*, 2014).

Pese a que existen estudios en distintos países sobre los beneficios de los SIT en la micropropagación de varias especies vegetales de importancia económica como *Coffea arabica*, *Saccharum officinarum*, entre otros; Ecuador no ha propuesto o desarrollado nuevos prototipos de sistemas de inmersión, los cuales puedan ser competitivos con los diseños actualmente distribuidos comercialmente, más bien, el enfoque se ha dirigido en la automatización de SITs ya existentes como el BIT (Azúa, 2017) y el RITA (Almachi, 2015).

1.3. Justificación

Es necesario el desarrollo e innovación de nuevos sistemas que sean eficientes y durables para solventar problemas, optimizar la producción y mejorar la calidad de las plantas, cuestión que los anteriores sistemas no proporcionan.

Es así que, el presente trabajo busca resolver varias de las problemáticas establecidas anteriormente. Como punto de partida, se establece modificar el principio que rige los procesos de inmersión y desecación. Se propone la

utilización de una rampa que sumergirá a los explantes en el medio, contrario al enfoque establecido en los SITs actuales, lo cual podría reducir los índices de hiperhidricidad, oxidación de los explantes y pérdida de biomasa (Etienne & Berthouly, 2002).

El empleo de un solo contenedor principal reducirá el número de recipientes empleados, de tal forma, se reducirá costos, espacio y reducirá el material necesario para el desarrollo y empleo del sistema. Además, su simplicidad estructural permitirá una apertura y cierre fácil, que agilizará la introducción del material vegetal. El volumen podrá ser variado de acuerdo a lo que se necesite y será ligero para ser esterilizado por autoclave y pueda ser transportado desde la cámara de flujo hasta la sala de cultivo.

Cabe destacar que la automatización del SIT propuesto logrará la reducción de costos de mano de obra y un mejor rendimiento. En la micropropagación *in vitro*, la automatización del proceso es un factor clave para obtener una cantidad masiva de plantas, ya que, de acuerdo a la especie vegetal, se pueden programar los tiempos de inmersión y de emersión en el medio nutriente, así de esta manera, se proporcionará un entorno óptimo, mejor distribución de los nutrientes y mejor transferencia de gases, al mismo tiempo que habrá menor estrés mecánico y preservará la integridad morfológica de las plántulas desarrolladas *in vitro* (Georgiev, Schumann, Pavlov & Bley, 2014).

Además, se ha reportado la efectividad de los SITs en diferentes etapas de desarrollo vegetal. En el estudio de Escalona *et al.* (1999) emplearon SITs para la micropropagación de *Ananas comosus* L. Merr, como resultado obtuvieron un incremento de la tasa de multiplicación y del peso fresco y seco después de 42 días, en contraste con los métodos convencionales. En Arencibia *et al.* (2013), por otro lado, realizaron la micropropagación de *Vaccinium corymbosum* L. usando BIT, obteniendo como resultado que las plántulas desarrolladas en el mismo mostraron altas tasas de crecimiento y de adaptabilidad que aquellas cultivadas en medios semi-sólidos.

Finalmente, el prototipo podrá ser empleado para todas las etapas del proceso de micropropagación y, de esta manera, obteniendo mejores rendimientos en comparación con los métodos convencionales de micropropagación.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Desarrollar un prototipo funcional y semi-automatizado de un Sistema de Inmersión Temporal que permita la micropropagación masal de especies vegetales.

1.4.2. Objetivos específicos

- Diseñar un Sistema de Inmersión Temporal destinado a la micropropagación masal de especies vegetales.
- Controlar y semi-automatizar el proceso mediante el empleo de componentes electrónicos y mecánicos.
- Validar la funcionalidad del diseño mediante el empleo de un modelo de micropropagación vegetal.

2. Capítulo II. Marco teórico

2.1 Utilización de modelos vegetales en el desarrollo de la biotecnología vegetal

Los avances en la biotecnología vegetal han generado un impacto significativo en el área del cultivo *in vitro*, manipulación genética y nuevos enfoques en la biología vegetal experimental (Basra, 1994; Chopra & Malik, 2000; Ganapathi, Suprasanna, Rao & Bapat, 2004; Ghosh, 1999; Soh & Bhojwani, 1999). En las décadas pasadas, el cultivo de tejido vegetal ha sido sometido a un constante desarrollo, generando conocimiento acerca de la totipotencia, diferenciación, nutrición y división celular, metabolismo, radiobiología, entre otros.

Mientras que los sistemas microbiológicos han sido utilizados para la producción de antibióticos y otros compuestos útiles, se ha vuelto posible la utilización del cultivo de tejido vegetal para la producción de una gran variedad de compuestos biológicamente activos, como alcaloides, esteroides, vitaminas, entre otros. Otros enfoques más sofisticados del tejido de cultivos incluyen la selección *in vitro*, fusión de protoplastos e ingeniería genética en plantas, que han demostrado tener un gran potencial de aplicación para el mejoramiento de cultivos agrícolas (Ganapathi, Suprasanna, Rao & Bapat, 2004).

La gran mayoría de los descubrimientos en el campo vegetal a nivel celular, cultivo de tejidos y biología molecular, se han originado a partir de la experimentación en plantas modelo, las cuales son especies que han sido ampliamente estudiadas y seleccionadas por su facilidad de investigar procesos biológicos relevantes que pueden ser aplicables a otras especies vegetales. Entre algunos ejemplos se destacan *Arabidopsis thaliana*, la cual ha sido el principal modelo vegetal en las últimas tres décadas y ha permitido grandes avances en la comprensión sobre el desarrollo vegetal como la señalización, las fitohormonas, la defensa contra patógenos, resistencia contra enfermedades y la respuesta contra el estrés abiótico; *Solanum lycopersicum*, es una planta solanácea que ha sido utilizada para el estudio del desarrollo de la fruta, crecimiento de la planta, desarrollo de hojas compuestas y resistencia a enfermedades; *Oryza sativa*, ha sido usado para el estudio de pastos por ser un

cultivo de importancia comercial, por poseer un genoma manejable y por su tamaño pequeño; *Antirrhinum majus*, ha permitido elucidar las bases moleculares de la identidad de los órganos florales, además ha ayudado en el estudio de la base del aroma, pigmentación y asimetría floral y *Medicago truncatula*, que ha sido utilizada para el estudio de la fijación de nitrógeno (Ammirato, Evans, Sharp & Yamada, 1984; Basra, 1994; Chang *et al.*, 2016).

Si bien las plantas modelo mencionadas anteriormente han sido escogidas por razones prácticas, como facilidad de cultivo, tamaño pequeño, corto tiempo generacional y fácil manipulación genética, ahora, gracias a las nuevas herramientas genéticas como ARNi, CRISPR/Cas9 y entre otras, permiten incrementar el campo existente de especies vegetales modelo en base a distintas consideraciones como relaciones filogenéticas (Chang *et al.*, 2016). Como resultado, el tabaco se ha vuelto un nuevo sistema de modelo en la biotecnología vegetal. Esta planta ha demostrado ser extremadamente versátil para todos los aspectos de investigación a nivel celular y en cultivo de tejidos (Ganapathi, Suprasanna, Rao & Bapat, 2004).

2.2 Tabaco (*Nicotiana tabacum*)

El tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) es una especie alotetraploide natural, formada a través de hibridación entre dos progenitores diploides: *Nicotiana sylvestris* y *Nicotiana tomentosiformis*, hace aproximadamente 6 millones de años (Okamuro & Goldberg, 1985).

Es una planta herbácea robusta y su tamaño por lo general oscila entre 1 a 3 metros de altura. Sus hojas ovadas y lanceoladas son usadas regularmente para fumar o masticar como fármaco por sus leves efectos estimulantes (Britannica, 2011). La clasificación taxonómica se halla descrita en la Tabla 1. (USDA, 2014).

Tabla 1.

Clasificación taxonómica de Nicotiana tabacum

Reino	Plantae
Subreino	Viridiplantae
Infrareino	Streptophyta
Súper división	Embryophyta
División	Tracheophyta
Subdivisión	Spermatophytina
Clase	Magnoliopsida
Súper-orden	Asteranae
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Género	<i>Nicotiana</i> L.
Especie	<i>Nicotiana tabacum</i> L.

Tomado de (USDA, 2014)

De aquellos experimentos iniciales con la toma de ADN desnudo a la transferencia de genes mediada por vectores, el tabaco ha permanecido como la especie más requerida para los sistemas de investigación vegetal. De igual forma, los experimentos relacionados a la transformación vegetal, expresión génica y estabilidad genética han sido desarrollados empleando tabaco (Ganapathi, Suprasanna, Rao & Bapat, 2004). En los últimos años, el tabaco se ha convertido en un modelo exitoso de experimentación vegetal. Es así que trabajando con cultivos de tejido de tabaco, Murashige y Skoog idearon un medio de cultivo *in vitro* que se ha convertido en el medio más empleado para un rango muy amplio de especies vegetales (Murashige & Skoog, 1962). Estudios *in vitro* con cultivo de tejidos de tabaco, usando diferentes factores químicos y físicos, han provisto de una visión del control del crecimiento y diferenciación. La inducción de haploides y selección de líneas celulares mutantes, debido a los experimentos con cultivos de tejido de tabaco se han vuelto herramientas útiles. El aislamiento, cultivo y regeneración de plantas a partir de protoplastos, así como también la hibridación somática, todas generadas a partir del tabaco como

sistema, que ha provisto de información invaluable en las formas de explorar el potencial de la hibridación somática en otros cultivos (Ganapathi, Suprasanna, Rao & Bapat, 2004).

La mayoría de avances realizados en la ingeniería genética en plantas son mayoritariamente realizados en tabaco. Actualmente, esta especie vegetal está siendo empleada en estudios para la producción de proteínas recombinantes, anticuerpos y compuestos químicos especiales, con mira a emplearlos exitosamente en la medicina e industria (Ganapathi, Suprasanna, Rao & Bapat, 2004). En el área del cultivo de tejido vegetal y manipulación genética, el trabajo llevado a cabo en tabaco es tan amplio que resultaría difícil resumirlo. Por tanto, a continuación, se demuestra una compilación del uso del tabaco en la biotecnología vegetal.

2.2.1. Estudios en cultivos *in vitro*

En una serie de publicaciones, Skoog y colaboradores (Skoog & Miller, 1957; Folke Skoog, 1944; Folke Skoog & Tsui, 1948) reportaron la inducción de retoños *in vitro* en *Nicotiana tabacum*, empleando un enfoque sistemático. Demostraron que la diferenciación entre brote y raíz puede ser inducida mediante la manipulación de un balance de auxinas y citoquininas. La presencia de adenina o kinetina en el medio resultó en la promoción de la diferenciación a brotes, mientras que el efecto de las citoquininas fue modificado por otros componentes en el medio, particularmente Ácido indolacético (AIA) o ANA. Un nivel mayor de auxinas indujo, por otro lado, la generación de raíces en cultivos de callo de tabaco. Los otros factores físicos, como temperatura, pH, fotoperiodo y concentración de sacarosa, influyó en la diferenciación a partir de cultivos de callos. Por otro lado, Skoog en 1944, estudió el efecto de distintos rangos de temperatura, de 5-33°C en el crecimiento de callos de tabaco y su diferenciación, observando que el crecimiento de los callos incrementó con el aumento de la temperatura hasta 33°C, pero para la formación de retoños, 18°C resultó ser la temperatura óptima. Igualmente, una alta intensidad de luz se encontró como inhibitoria para la formación de retoños en el tabaco (Thorpe & Murashige, 1970).

Donde, la regeneración de retoños se observó en presencia de luz azul, mientras que la formación de raíces ocurría en luz roja.

Se han realizado estudios extensivos para varios parámetros, controlando la formación de flores y la inducción de células epidérmicas de tabacos dihaploides, que fueron obtenidos a partir de flores fértiles generadas a partir de plantas masculinas estériles. (Tran Thanh Van, Richard & Gendy, 1990). Por tanto, se obtuvieron hipoploides con menos cromosomas dihaploides de cultivos de células epidérmicas, las cuales estaban libres de influencia hormonal endógena (Tran Thanh Van *et al.*, 1990), haciendo que sea más fácil estudiar los cambios en una sola célula, dando lugar a la diferenciación. Hicks & Sussex (1970) cultivaron primordios de flores de tabaco. Posteriormente, brotes que poseía únicamente sépalos primordiales fueron cultivados, dando lugar a pétalos, estambres y carpelos en secuencias de los acropétalos en el ápice. De igual manera, los primordios de los brotes de flores de tabaco fueron sometidos a manipulaciones quirúrgicas.

Existen reportes respecto a la organogénesis en tejidos de tabaco y sus correspondientes callos. La regeneración de plántulas se reportó a partir de explantes de hojas cultivadas (Ganapathi, Suprasanna, Rao & Bapat, 2004). La formación de brotes fue inducida en cultivos de peciolos de tabaco (Prabhudesai & Narayanaswamy, 1974). Se regeneraron plantas a partir de callos obtenidos de cotiledones de un híbrido de *Nicotiana suaveolens* y *Nicotiana tabacum* y la resistencia que posee *N. suaveolens* frente a *Septoria glycines*, fue transferida a *N. tabacum* (Reed & Collins, 1978). Cambios estructurales y celulares en la regeneración de brotes en tabaco también han sido estudiados (Arai, Saito, Kaneko & Matsushima, 1997).

Igualmente, datos experimentales con respecto al efecto de los reguladores de crecimiento, temperatura y luz en cultivos de tejidos de tabaco han contribuido al conocimiento básico acerca del rol de diferentes factores en la diferenciación que han podido ser extendidos a otros cultivos de importancia (Ganapathi, Suprasanna, Rao & Bapat, 2004). Algunos ejemplos corresponden a los estudios realizados en *Lilium longiflorum* Thunb cv. Pavia (Bhandari & Aswath, 2018); *Vitis*

vinífera L. cv. Cabernet Sauvignon (Dai, Meddar, Delrot & Gomés, 2015); *Achillea millefolium* L. (Alvarenga, Pacheco, Silva, Bertolucci & Pinto, 2015); *Passiflora edulis* (Antoniazzi *et al.*, 2018); *Pisum sativum* L. cv. Century (Mroginski & Kartha, 1981); *Indica* spp. (Alaka *et al.*, 2018) y *Selaginella* spp. (Yu, Baniaga, Jorgensen & Barker, 2017).

2.2.2. Estudios en cultivos de polen y anteras

Se sabe que el cultivo de anteras ha sido empleada satisfactoriamente para la producción de haploides y ha generado un interés considerable dentro de los genetistas y criadores de plantas (Basra, 1994b; Maheshwari, Rashid, & Tyagi, 1982).

La mayor ventaja constituye la recuperación de diploides homocigotos destinados al cultivo y para el establecimiento de cultivos celulares haploides para estudios mutacionales y experimentos de manipulación genética (Ganapathi, Suprasanna, Rao & Bapat, 2004). Estudios extensivos conducidos mediante cultivo de anteras de tabaco han dado lugar a la generación de la identificación de factores críticos para el desarrollo exitoso de haploides. Reinert, Bajaj, Nitsch, Clapham, & Jensen (1977) reportaron, por primera vez, la obtención de plántulas haploides generadas a partir de *N. tabacum*. Esto fue seguido de investigaciones en la regeneración de plántulas haploides a partir de cultivo de anteras de diferentes especies del género *Nicotiana*. Tres líneas promisorias de tabaco fueron obtenidas a través del cultivo de anteras de híbridos (líneas MC-1610xCoker 139) (Ganapathi, Suprasanna, Rao & Bapat, 2004). Las nuevas líneas exhibían una alta resistencia a infecciones bacterianas y aquellas causadas por *Phytophthora Nicotianae*, sin perder las facultades químicas y agrícolas de la línea MC-1610. De igual manera dobles haploides de tabaco fueron generados usando cultivo de anteras (Vose & Blixt, 1983), los cuales demostraron un alto rendimiento, gran calidad de hojas y resistencia a enfermedades, características obtenidas en un periodo más corto, comparado con la práctica de cultivo tradicional. Finalmente, en China, nuevas variedades

de tabaco han sido liberadas usando el cultivo de anteras y ahora son cultivadas en más de 20000 hectáreas (Ganapathi, Suprasanna, Rao & Bapat, 2004).

Primeramente, se sabe que la mitosis del polen fue reportada como la etapa crítica para el cultivo de anteras (Sunderland & Wicks, 1971). Los factores físicos, como luz, temperatura, pH, entre otros, también demostraron encontrarse entre los factores de los patrones de respuesta. Por ejemplo, las anteras de tabaco que permanecían en la oscuridad al inicio de los experimentos respondieron mejor en comparación con aquellas que fueron expuestas a la luz (Sunderland & Roberts, 1977). De igual forma, el enfriamiento de las anteras previo al cultivo o un tratamiento en frío de los brotes de flores también aumentaban la embriogénesis en tabaco (Reinert *et al.*, 1977; Sunderland & Roberts, 1977). Además, Deaton, Collins, & Nielsen (1986) estudiaron el vigor y variación expresada por plántulas de polen de tabaco. Sin embargo, (Zeppernick, Schäfer, Paasch, Arnholdt-Schmitt, & Neumann, 1994) estudiaron la relación entre el nivel de plodía, morfología y concentración de nicotina de haploides y dobles haploides generados a partir del cultivo de anteras.

En general, el éxito en la producción de embriones a partir de los cultivos de anteras depende de una gran cantidad de factores, como el método de cultivo, composición hormonal y nutricional del medio, etapa de desarrollo de la microspora y ontogenia de los embriones de polen, así como también de las condiciones de crecimiento de las plantas donantes. La utilidad de los haploides está basada en la asunción de que las líneas homocigotas generadas pueden ser obtenidas rápidamente. Los haploides pueden ofrecer líneas de cultivo suplementarias para los programas de fitomejoramiento y el conocimiento que se ha generado en relación al método de cultivo, tratamiento y reguladores de crecimiento puede ser aplicado para el cultivo de anteras en otros cultivos de importancia (Ganapathi, Suprasanna, Rao & Bapat, 2004).

2.2.3. Estudios en Variación genética y selección de mutantes

La selección de mutantes a partir del cultivo de tejidos ha sido posible debido a la ocurrencia de un alto grado de variabilidad (variación somaclonal) en los cultivos celulares. Este hecho permite que, dentro de un cultivo en agitación, se realice la selección de mutaciones específicas a nivel celular, y, en consecuencia, regenerar plantas partiendo de las líneas celulares seleccionadas para específicas mutaciones, que puedan ser cultivadas en campo (Suprasanna & Rao, 1997). Varios tipos de mutágenos físicos y/o químicos han sido ampliamente empleados en callos, suspensiones celulares o protoplastos, a fin de aislar aquellos mutantes de interés.

Los cultivos de tejidos vegetales o de células vegetales han demostrado causar o permitir diferentes cambios genéticos. La variabilidad en el contenido de DNA o volumen nuclear se ha reportado en la regeneración de cultivos de tabaco (Berlyn, 1983). Un incremento en la ploidía, reordenamientos cromosomales y cromosomas anormales, junto con el contenido de DNA alterado en la regeneración de plántulas ha sido empleado efectivamente en los programas de mejoramiento de tabaco. El destino y posible rol de ciertas aberraciones (cromosomas dicéntricos) fueron estudiados en el desarrollo de diferentes fases embriogénicas (Toncelli, Martini, Giovinazzo, & Ronchi, 1975). Muchas quimeras cromosomales fueron observadas en callos derivados de tabacos regenerados y la transmisión de dichas quimeras fue reportado para las plantas de progenie (Ogura, 1976).

Para la selección de mutantes, las células de tabaco son el material preferente debido a su habilidad de regeneración, junto con la capacidad de los callos de tabaco para formar suspensiones celulares finas que crecen rápidamente. Carlson (1970) aisló mutantes auxotróficos de tabaco usando técnicas de selección desarrolladas para cultivo celular animal. La 5' bromodesoxiuridina fue empleada en estas técnicas para seleccionar 6 clones de tabaco, demostrando aquellos requerimientos de crecimiento parcial (Carlson, 1970). Por otro lado, se seleccionaron clones de *N. plumbaginifolia* que necesitaban de isoleucina,

leucina y uracilo (V. Sidorov, Menczel, & Maliga, 1981). Variantes sensibles a temperatura de *N. tabacum* fueron igualmente aisladas exitosamente.

Líneas celulares de tabaco resistentes a altas concentraciones de cloruro de sodio (0.88%) han sido aisladas (Nabors, Daniels, Nadolny, & Brown, 1975; Nabors, Gibbs, Bernstein, & Meis, 1980). Las plantas regeneradas de estas líneas también retuvieron la tolerancia a través de dos generaciones sexuales consecutivas. (Spanswick, Lucas, & Dainty, 1980) obtuvo plantas tolerantes al cloruro de sodio en *N. sylvestris* y observó que los caracteres eran transmitidos a la siguiente generación. Varias líneas celulares de *N. tabacum* resistente a varios herbicidas, como Bentazona (Radin & Carlson, 1978), Amitrola (Barg & Umiel, 1977), Paraquat (Miller & Hughes, 1980), Picloram (Chaleff & Parsons, 1978) han sido también aisladas. Adicionalmente, tanto el glicerol como la lactosa han sido utilizadas exitosamente para la detección de células de tabaco mutantes (Ganapathi, Suprasanna, Rao & Bapat, 2004).

Otra aplicación incluye la selección de mutantes resistentes a enfermedades. La resistencia de plantas a virus y a su transmisión a la progenie se ha reportado en tabaco (Toyoda, Chatani, Matsuda, & Ouchi, 1989). Clones únicos de tejido de tabaco variaron en su susceptibilidad a virus y a infecciones fúngicas y sus aplicaciones. Una población de células haploides de tabaco mutagenizadas fue cultivada en un medio que contenía concentraciones inhibitorias de metionina, ya que *Pseudomonas tabacii*, una bacteria muy común en infecciones a plantas de tabaco produce metionina. Las células *in vitro* que sobrevivieron, producidas en niveles inhibitorios de metionina, fueron posteriormente empleadas para generar variedades resistentes a la enfermedad (Carlson, 1970). Por otro lado, en plantas generadas a partir de callos a partir de un híbrido interespecífico de tabaco, la variabilidad en la altura de las plantas, número de días hasta la floración, número de hojas y superficie de las hojas también fueron reportados (Venkateswarlu, Subashini & Reddi 1987).

Así, a partir de los estudios realizados en tabaco, se han realizado avances con otras especies (Daub, 1986). Algunos ejemplos son los realizados en *Arabidopsis thaliana* a fin de obtener líneas resistentes a sulfonilurea (Haughn &

Somerville, 1986) y al ácido abscísico (Koornneef, Reuling & Karssen, 1984); en *Kochia scoparia* para dar lugar a resistencia a herbicidas de imidazolinona (Primiani, Cotterman & Saari, 1990), al igual que *Zea mays* L. (Newhouse, Singh, Shaner & Stidham, 1991) y en *Capsicum annuum* y *Lycopersicon hirsutum* para obtener resistencia al virus Y de la papa (Moury *et al.*, 2004).

2.2.4. Estudios en Aislamiento, Cultivo y Fusión de protoplastos

El aislamiento, cultivo, fusión de protoplastos vegetales y regeneración de plantas ha dado lugar a grandes esperanzas para el fitomejoramiento. La ausencia de paredes celulares permite la fusión entre protoplastos, derivados a partir de dos plantas diferentes, que son sexualmente incompatibles, así como también la toma de material genético foráneo, tanto organelos o DNA, en el genoma. Así, Nagata & Takebe (1971) describieron por primera vez la regeneración de plantas completas a partir de protoplastos de mesófilos de *N. tabacum*. Posteriormente, otros autores reportaron la regeneración de plantas enteras a partir de protoplastos de mesófilo de tabaco (Chupeau, Missonier, Hommel & Goujoud, 1978; Vasil & Vasil, 1974). Los protoplastos derivados de tabaco haploide también han demostrado tener potencial de regeneración (Conger, 2018). Las hojas son consideradas una fuente ideal de protoplastos de tabaco gracias a que pueden ser conservadas en suministros abundantes mediante el cultivo *in vitro* de puntas de brotes o a partir de plantas crecidas en invernaderos. Además, un alto porcentaje de los protoplastos pueden reformar su pared celular y dividirse para producir callos. Los protoplastos pueden también ser aislados de la epidermis, suspensiones celulares, callos, entre otros. Igualmente, los parámetros que afectan a la iniciación de la división de protoplastos de tabaco haploide o diploide han sido evaluados (Van Slogteren, Planqué & Lekkerkerk, 1980).

La hibridación somática ha asumido una gran significancia dentro de muchas aplicaciones de la tecnología de protoplastos. Los experimentos destinados a la selección de híbridos somáticos, con la ayuda de mutantes albinos, fueron realizados por primera vez en tabacos haploides (Melchers & Labib, 1974).

Posteriormente, resultados similares fueron obtenidos con combinaciones interespecíficas de mutantes albinos fotosensibles de *N. sylvestris* (Melchers & Labib, 1974). Los mutantes albinos no alélicos también fueron usados para *N. tabacum* y *N. knightiana*, que fue incapaz de producir brotes tanto como lo hacía el tabaco y la síntesis de clorofila de *N. knightiana*. El primer híbrido somático vegetal fue reportado después de haberse realizado la fusión de protoplastos de *N. glauca* x *N. langsdorffii*, con la ayuda de nitrato de sodio (Carlson, Smith & Dearing, 1972). Por otro lado, protoplastos generados a partir de la línea celular de *N. sylvestris* resistente a kanamicina que no poseían la habilidad para formar brotes fueron fusionados con protoplastos de *N. knightiana* que no forman brotes *in vitro*. Los híbridos somáticos fueron obtenidos en base a la resistencia a kanamicina y a la capacidad para regenerar brotes (Maliga *et al.*, 1977). Patrones de crecimiento vigorosos de colonias híbridas también fueron utilizados para aislar híbridos from *N. glauca* y *N. langsdorffii* (Smith, Kao & Combatti, 1976). Varios experimentos de fusión en tabaco fueron conducidos usando mutantes de plastoma en relación a la síntesis de clorofila y a la esterilidad masculina citoplasmática donde se observó segregación de citoplasmas mixtos en los mutantes y plastoma WT (Gleba & Hoffmann, 1979; Sidorov, Menczel, Nagy & Maliga, 1981). Protoplastos irradiados con radiación Gamma, los cuales poseen un gen *nptII* funcional, fueron fusionados con protoplastos no irradiados y sensibles a la kanamicina para la generación de híbridos asimétricos (Bates, 1990).

La factibilidad de esta técnica al nivel de aplicación determinará posteriormente la practicidad de los híbridos somáticos como complementaria para los métodos tradicionales de cultivo. A pesar de la fusión de protoplastos, varios experimentos han sido conducidos en protoplastos de tabaco para otros variados aspectos de la manipulación genética. (Ganapathi, Suprasanna, Rao & Bapat, 2004).

2.2.5. Estudios en Biotransformación y Producción de metabolitos secundarios

Los cultivos celulares vegetales sintetizan metabolitos secundarios, gracias a la totipotencia, y esto posee una gran significancia, no solo para la investigación

básica, sino también para los procesos industriales. (Ganapathi, Suprasanna, Rao & Bapat, 2004). Ohta & Yatazawa (1989) revisaron la producción de nicotina en los cultivos de tejido de tabaco. Se detectó nicotina en un rango de 0.1-1 mg/mg de peso seco en los cultivos celulares de tabaco, mientras que 29 mg/mg de peso seco fue encontrada en las raíces de plantas intactas (Krikorian & Steward, 2012). Se observó que la síntesis de nicotina en el tabaco podía estar regulada por suministros exógenos sin recurrir a la organogénesis (Furuya, Kojima & Syono, 1971). De la misma manera, una relación cercana entre la organización celular y la producción de nicotina en el cultivo de tejidos de tabaco (Tabata & Hiraoka, 1976). Al contener clones de una sola célula, cepas con un alto rendimiento de nicotina fueron aisladas. Se empleó la técnica de aislamiento por colonia, donde un número de colonias fueron aisladas de los cultivos celulares de *N. cellrústica*, las cuales demostraron un amplio rango de variaciones en sus características de crecimiento y habilidad para sintetizar nicotina (Tabata & Hiraoka, 1976). Además de la nicotina, otros metabolitos secundarios han sido detectados en los cultivos celulares de tabaco, como: alcanos alifáticos (Weete, Venketeswaran & Laseter, 1971), esculetina, cicloartenol, citroastradiol, entre otros (Phillips, Rasbery, Bartel & Matsuda, 2006). Igualmente, los cultivos celulares de *Nicotiana* han demostrado su habilidad para transformar compuestos orgánicos, referidos como biotransformación, como por ejemplo la transformación de N-difenilurea en D-glucosa (Burrows & Leworthy, 1976). Por otro lado, los microsomas provenientes del cultivo de tejidos de tabaco han demostrado ser capaces de convertir epóxido 2,3 de escualeno en cicloartenol (Heintz & Benveniste, 1970). Estos ejemplos han abierto la posibilidad para identificar líneas celulares con un alto rendimiento de nicotina. El trabajo en la biotransformación en *Nicotiana* perteneciente a varios compuestos ha demostrado las posibilidades de utilizar cultivos de tejidos y células vegetales para el aislamiento de varios compuestos útiles (Ganapathi, Suprasanna, Rao & Bapat, 2004).

Con esta finalidad, una de las líneas celulares más importantes que se han desarrollado son las células de tabaco Bright Yellow-2 o BY-2, que son ampliamente empleadas como material biológico, destinado al estudio de la

morfología y fisiología a nivel vegetal. Adicionalmente, estas células son fácilmente transformables y son capaces de mantenerse en forma de suspensiones celulares, junto con su capacidad para tolerar la transformación con proteínas fluorescentes (Brandizzi, Irons, Kearns & Hawes, 2003).

2.2.6. Estudios en Transgénesis y Aplicaciones

Estudios llevados a cabo por Uchimiya y Murashige con DNA de tabaco y protoplastos de tabaco demostraron la toma de DNA homólogo (Nitsch & Ohyama, 1971). Por otro lado, Suzuki y Takebe demostraron la inserción de DNA viral en protoplastos de mesófilo de tabaco (Uchimiya & Murashige, 1974). Mientras tanto, *Agrobacterium tumefaciens*, una bacteria edáfica, es conocida por inducir la enfermedad de corona de agallas en muchas especies vegetales. Durante el proceso de infección, un plásmido bacteriano integra su genoma e influye en el tejido vegetal para formar tumores. Así, usando *A. tumefaciens*, se transformaron suspensiones celulares de tabaco (Sigg, Smith & Hindley, 1982; Suzuki & Takebe, 1976), demostrando la presencia de nopalina, el aminoácido que codifica el DNA del plásmido. Los primeros experimentos con tabaco generaron interés en el uso de esta bacteria para la transformación, y, en años recientes se ha convertido en el vector más importante para la transferencia genética. Márton *et al.* (1979) presentaron evidencia, al usar cloroplastos de tabaco, en que la transformación mediada por *Agrobacterium* puede ser usada para introducir genes foráneos en cloroplastos de especies vegetales superiores por recombinación homóloga de sitio específica.

Un método simple y general empleado para la transformación usando discos de tabaco fue desarrollado por Hess (1987), y se ha vuelto en la metodología estándar para la generación de plantas de tabaco transgénicas. Se cortan *in vitro*, discos de hojas de tabaco, de aproximadamente 1 cm², de un cultivo generado en medio MS con ABA y ANA. Después de dos días, los discos son co-cultivados con un cultivo de *A. tumefaciens* que ha crecido durante la noche. Posterior a un proceso de co-infección de treinta minutos, los discos son marcados para eliminar el exceso de bacterias y transferidos a placas con

medios de cultivo frescos conteniendo medio MS con ABA y ANA. Seguido a tres días de co-cultivo, los discos de hojas son transferidos a un medio de selección usando kanamicina y carbenicelina o cefotaxima. Los brotes generados son enraizados en un medio de enraizamiento conteniendo ANA con una alta concentración de kanamicina. Aquellas plantas que enraizaron en este medio pueden ser consideradas en su mayoría como transgénicas, por lo que resulta necesario emplear otros ensayos (Ganapathi, Suprasanna, Rao & Bapat, 2004).

Mediante el empleo de tabaco como un sistema experimental, la transferencia de genes útiles ha sido posible, por ejemplo, para la resistencia contra insectos, tolerancia a herbicidas y resistencia al estrés y enfermedades varias. Así, para el desarrollo de tolerancia a herbicidas, el gen de *Arabidopsis thaliana csr-1-1* fue transferido a una variedad de tabaco (Klein *et al.*, 1988). Por otro lado, la resistencia a *Pseudomonas syringae pv.* fue introducida en plantas transgénicas de tabaco al expresar el gen de resistencia a la toxina (Miki *et al.*, 1999). De igual forma, una significativa resistencia al virus del mosaico del tabaco fue lograda mediante la expresión de la replicasa viral (Anzai, Yoneyama & Yamaguchi, 1989). El tabaco genéticamente modificado para ser resistente al virus CMV de tabaco dio lugar a un promedio de 5-7% más hojas, resultando en 2-3 aplicaciones menos de insecticida. Este tabaco ha sido empleado en pruebas de campo en China desde 1991, y ahora es empleado por la industria de ese país para su consumo a nivel nacional. Mediante el empleo del gen que codifica para la endotoxina δ de *Bacillus thuringiensis*, bajo el control del promotor CaMV 35S, cuatro líneas de tabaco fueron desarrolladas basadas en la toxicidad para los gusanos del tabaco en experimentos llevados a cabo en invernadero (Golemboski, Lomonossoff, & Zaitlin, 1990). Otro ejemplo es la expresión del gen de la manitol deshidrogenasa de *E. coli*, que permitió obtener una acumulación de manitol en tabaco (Sardana *et al.*, 1996).

El tabaco transgénico, que expresaba el RNA satélite y el gen de la proteína de la cápside del virus del mosaico del pepino, demostraron resistencia al virus bajo inoculaciones naturales y mecánicas. (Ganapathi, Suprasanna, Rao & Bapat, 2004). Por otra parte, el gen de la proteína de envoltura del virus Y de la papa fue clonado y secuenciado a partir de un aislado (Verbruggen & Hermans, 2008).

El gen de la proteína de la cápside fue posteriormente sub-clonado en el vector de expresión vegetal pBINPLUS y discos de hoja de tabaco variedad “Havana 425” fueron transformados usando *Agrobacterium tumefaciens*. A continuación, el análisis molecular confirmó la integración del gen de la proteína de la cápside. Todas las plantas transgénicas eran morfológicamente similares a los controles no transformados, con respecto a la apariencia, floración y semillas (Ganapathi, Suprasanna, Rao & Bapat, 2004). La resistencia fue ensayada al infectar tanto a las plantas control como a las plantas transgénicas con el virus, finalizando con un ensayo *ELISA* para determinar la acumulación de virus. Se demostró que todas las líneas transgénicas mostraban una muy buena resistencia frente a la acumulación del virus posterior a la infección. Los resultados demostraron claramente que el aislado del virus puede ser usado para generar resistencia en tabaco, y que dicha resistencia no está correlacionada con el nivel de expresión de la proteína de envoltura del virus en el tabaco transgénico (Verbruggen & Hermans, 2008).

La fitorremediación, un tipo de biorremediación en la que intervienen plantas, se ha vuelto una realidad para la remoción segura de compuestos orgánicos en agua o suelos contaminados. La habilidad natural de ciertas especies vegetales para la toma de metales pesados y elementos radiactivos está siendo explotada para estos procesos de biorremediación (Salt *et al.*, 1995)

Es por ello que plantas de tabaco transgénico han sido genéticamente diseñadas para expresar una enzima bacteriana denominada nitroreductasa, las cuales son para detoxificar 2,4,6-trinitrotolueno en suelos afectados (Zhang, Rylott, Bruce, & Strand, 2017). Unas amplias variedades de bacterias edáficas poseen un vasto rango de enzimas capaces de degradar insecticidas y herbicidas. Los genes que codifican para dichas enzimas pueden ser clonados y expresados en plantas de tabaco para su empleo en fitorremediación (Rasmussen, Kikkert, Roy, & Sanford, 1994).

Las plantas de tabaco han sido empleadas extensivamente para la investigación en transgénicos, razón por la que esta especie vegetal continúa siendo la planta modelo de elección (Hannink *et al.*, 2001). Así, la primera prueba de campo para

cultivos transgénicos fue realizada con tabaco en Francia y Estados Unidos en 1986 (Ganapathi, Suprasanna, Rao & Bapat, 2004). El tabaco también fue el primer cultivo en ser comercializado en China y Estados Unidos en 1991 y 1994 respectivamente, donde las plantas transgénicas resistentes a TMV crecieron en más de un millón de hectáreas en China para 1994, dando lugar a 5-7% más hojas por planta (Miki *et al.*, 1999).

2.2.7. Estudios en *Molecular Farming*

Varias proteínas recombinantes están siendo producidas en plantas transgénicas, que actúan como biorreactores, para la producción a larga escala de compuestos farmacéuticos o industriales comercialmente importantes (Cramer, Boothe & Oishi, 2000; Dale, 1995; Giddings, Allison, Brooks & Carter, 2000; Kusnadi, Nikolov & Howard, 1997; Staub *et al.*, 2000). El tabaco ha servido como el sistema vegetal de elección para la producción de proteínas con un potencial uso terapéutico (Hansen, 1997; Ruggiero *et al.*, 2000). Así, el tabaco es un biorreactor vegetal ideal para *Molecular Farming* ya que las proteínas farmacéuticas son producidas en sus hojas y la producción en este sistema no requiere de floración (Ganapathi, Suprasanna, Rao & Bapat, 2004).

Las hojas contienen alrededor de 10% de proteína y cerca de 4942 kg de proteína/hectárea/año pueden ser producidos. De igual forma, el tabaco es una especie prolífica para la producción de semillas con cerca de 1 millón de semillas por planta. El primer producto sintetizado en una planta transgénica es un derivado del anticuerpo de tabaco para enfermedades de las encías (Ganapathi, Suprasanna, Rao & Bapat, 2004).

La mayoría de los tipos de tabaco secretan compuestos pegajosos en la superficie exterior de las hojas como una de las primeras líneas de defensa y algunas variedades producen un 16% del peso seco de la hoja como esta goma. Científicos de la Universidad de Kentucky aislaron un promotor para controlar el tipo de compuestos que son secretados por los pelos de las hojas de los tabacos. Colocando como objetivo a proteínas recombinantes en las gomas de tabaco se

ofrecían ventajas significativas y la purificación podía realizarse de una manera mucho más fácil y más barata (Kusnadi *et al.*, 1997).

Varios tipos de anticuerpos son usados en la medicina humana para el diagnóstico, así como también para propósitos terapéuticos (Woodard, Howard & Horn, 2004). Los anticuerpos recombinantes han sido producidos en plantas transgénicas de tabaco. La expresión y ensamblaje de inmunoglobulinas G dieron lugar a la producción de otros anticuerpos como inmunoglobulinas A, frente a antígenos de superficie de *Streptococcus mutans*, diseñados para la prevención de enfermedades bucales (Kapusta *et al.*, 1999).

Los costos estimados de producción para un anticuerpo en plantas indican que son de 10 a 20 veces menores por gramo, comparados con la producción que se lleva a cabo en cultivos celulares. Por otro lado, desde que los niveles de expresión basados en sistemas vegetales son bajos, la transformación de cloroplastos parece ser una alternativa (Ganapathi, Suprasanna, Rao & Bapat, 2004). Puesto que hay cerca de 10000 copias de plastomas por célula, esto puede facilitar la introducción del mismo número de copias de genes de interés por célula transformada y subsecuentemente esto podría potenciar 100 veces la expresión génica, en relación a la transformación nuclear (Daniell *et al.*, 1997).

Las vacunas son especialmente significativas para la salud humana. Sin embargo, en varios países en desarrollo, la incidencia de enfermedades infecciosas y la escasa distribución de programas de inmunización limitan el uso de vacunas disponibles para grandes porciones de la población de dichos países. Las vacunas realizadas con genes que codifican antígenos para enfermedades como la diarrea de los viajeros, hepatitis B, enteritis de visón, gastroenteritis, entre otros, han sido expresadas en diferentes sistemas vegetales, incluyendo al tabaco (Arakawa *et al.*, 1998; Beachy, Fitchen & Hein, 1996; Daniell, Streatfield, & Wycoff, 2001; Fitchen, Beachy & Hein, 1995; S. Ghosh, Malhotra, Lalitha, Guha-Mukherjee & Chauhan, 2002; Haq, Mason, Clements & Arntzen, 1995; Kapusta *et al.*, 1999; H S Mason *et al.*, 1996; Hugh S. Mason & Arntzen, 1995; McCormick *et al.*, 1999; Staczek, Bendahmane,

Gilleland, Beachy & Gilleland, 2000; Tackaberry *et al.*, 1999; Turpen *et al.*, 1995; Verch, Yusibov & Koprowski, 1998).

El primer estudio en la producción de vacunas basadas en sistemas vegetales fue realizado en tabaco, con la esperanza de desarrollar un producto económico (Kapusta *et al.*, 1999). También se demostró que el antígeno rHBsAg fue capaz de ensamblarse en partículas sub-virales, idéntico al plasma y a levaduras, derivando en la producción de anticuerpos específicos en ratones (Woodard *et al.*, 2004). La expresión de la toxina B del cólera fue demostrada en cloroplastos de tabaco transgénicos, resultando en la acumulación de 4.1% del total de la proteína soluble en hoja, como oligómeros funcionales de dicha toxina (Woodard *et al.*, 2004). Adicionalmente, ensayos de unión confirmaron el correcto plegamiento y formación de puentes disulfuro de los pentámeros del pentámero de la toxina. La expresión de la región terminal de la proteína de superficie PfMSP119 de *Plasmodium falciparum*, un candidato potencial para el desarrollo de la vacuna contra la malaria, se reportó en plantas de tabaco (McCormick *et al.*, 1999). Los ensayos de *Inmunoblot* demostraron que la transformación de la proteína expresada en el sistema vegetal presentaba características estructurales e inmunológicas idénticas a la proteína expresada en *E. coli*, lo cual representaría un avance significativo en el desarrollo para una vacuna funcional frente a la malaria.

La línea celular de tabaco (NT-1) fue transformada con el gen "s" del virus de la hepatitis B, codificante para un antígeno de superficie (Tuboly *et al.*, 2000). Se emplearon dos vectores de transformación, el Pher100 y el Phbs100, con y sin señal de retención en el retículo endoplásmico. La integración del transgénico fue analizada por *PCR* e hibridación *Southern Blot*, finalizando con la determinación del nivel de expresión por *ELISA*. La expresión máxima fue de 2 ug/g de peso fresco. Los análisis realizados por *Western Blot* confirmaron la presencia de una banda de 24 kDa, específica para el antígeno en las células transformadas. De igual forma, fue reportada por primera vez la secreción de partículas del antígeno por células vegetales al medio de cultivo (Ganapathi, Suprasanna, Rao & Bapat, 2004).

Finalmente, la disponibilidad de metodologías para la transformación genética de plantas ha ampliado los tipos de problemas experimentales, la diversidad de tipos de células que pueden ser empleadas y la transferencia de genes útiles. Estas investigaciones prometen hacer de los sistemas vegetales, fuentes extremadamente atractivas y poderosas para el fitomejoramiento, más allá del estudio de la regulación de genes y biología de desarrollo en plantas superiores. (Ganapathi, Suprasanna, Rao & Bapat, 2004).

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, el tabaco ha sido y será un sistema vegetal modelo adecuado para la investigación. Es por ello que ha sido escogido para poner a prueba el SIT del presente trabajo ya que a partir del mismo, se podrá realizar investigaciones posteriores con otras especies vegetales.

2.3. Sistemas de Inmersión Temporal (SIT)

En 1983, Harris y Mason, desarrollaron un trabajo acerca de un sistema de máquinas basculantes empleadas para lograr la inmersión temporal, a fin de combinar el cultivo *in vitro* mediante el empleo de medio de cultivo líquido junto con aireación. Los autores indicaron que Steward *et al.* (1952) habían descubierto que los explantes radiculares de zanahoria no crecieron rápidamente cuando estos eran sumergidos completamente en medio líquido, por lo que dedujeron que el problema se encontraba en la carencia de oxígeno. Por tanto, diseñaron un sistema conocido como "*auxophyton*", que se encargaba de dar vuelta a los recipientes de cultivo en una rueda, generando sumersión como aireación para los explantes. Así, después de 20 días de cultivo, los explantes de zanahoria pesaban 3 veces más que aquellos cultivados en medio semi-sólido (Harris & Mason, 1983).

A partir del trabajo de Harris y Mason, una amplia y variada gama de sistemas semi-automáticos basados en el principio de inmersión temporal han sido desarrollados. Todos estos sistemas cumplen las condiciones establecidas por Teisson & Alvard (1999): evitar la inmersión constante, que afecta adversamente al crecimiento y la morfogénesis; otorgar una transferencia ideal de suficiente

oxígeno, al mezclar y limitar los niveles de corte; permitir frecuentemente los cambios del medio de cultivo y la automatización; reducir los riesgos de contaminación y minimizar los costos (Etienne & Berthouly, 2002). Por tanto, los sistemas de inmersión propuestos hasta la fecha difieren en relación con el tamaño del contenedor, el tipo de soporte empleado para el cultivo, la inclusión de una automatización completa o semi-automatización, mediante la utilización de una bomba de aire, o una bomba peristáltica, entre otros, a fin de desplazar el medio de cultivo líquido hacia los explantes, y finalmente, la separación o inclusión de la cámara de cultivo dentro de la cámara del medio nutriente. Adicionalmente, estos sistemas son más fáciles de usar que los biorreactores, junto con la incorporación de periodos de subcultivo mucho más largos. Así, la originalidad de estos sistemas radica en permitir el contacto parcial o total programable entre el medio de cultivo y el explante (Etienne & Berthouly, 2002).

Los sistemas que se han diseñado se pueden dividir en:

2.3.1. Sistemas con máquinas basculantes

Harris & Mason (1983) reportaron dos máquinas. La máquina de inclinación perfila a 30 grados, frascos *Erlenmeyers* en sentidos opuestos; posee una capacidad para 400 matraces de 50 mL o 320 matraces de 125 mL. Por otra parte, la máquina basculante rota 70 frascos de boca ancha de 910 mL que se encuentran dispuestos horizontalmente, o gira, cada 30 segundos, 120 tarros de boca ancha de 455 mL, colocados a unos 40 grados. Su problema está en que estas máquinas no incluyen la restauración del medio de cultivo (Etienne & Berthouly, 2002).

2.3.2. Sistemas con inmersión completa y mecanismo de renovación de medio líquido

Tisserat & Vandercook (1985) diseñaron una cámara de cultivo de gran tamaño que se halla a una altura elevada, la misma es drenada y rellenada constantemente con medio de cultivo líquido en un ambiente estéril. El Sistema Automatizado de Cultivo de Plantas (APCS) (Fig. 1) comprende dos tubos de

silicona, dos bombas impulsoras, dos envases de vidrio donde se coloca el medio de cultivo, una válvula de acero inoxidable de 3 vías, un envase que actúa como cámara de cultivo para los explantes y una interfaz de placas asociadas a un interruptor.

En el presente estudio se utilizó diferentes especies vegetales como brotes de *Potinera* sp. Híbrida “*Mount Pelee*”, de *Mitragyna inermis* O. Kuntze y de *Callistephus hortensis*; callos derivados de brotes de *Pheonix dactylifera* L. cv. “*Deglet Noor*” y callos derivados del pecíolo de *Daucus carota* L. “*Danvers Half Long*”. Los resultados obtenidos fueron el aumento de las tasas de crecimiento de cada una de las especies antes mencionadas y disminución del daño físico ocasionado por la constante transferencia a recipientes con medio fresco. De esta manera, se demuestra que este diseño provee el ambiente óptimo para el desarrollo de distintas especies vegetales y es un método a largo plazo para el cultivo *in vitro*.

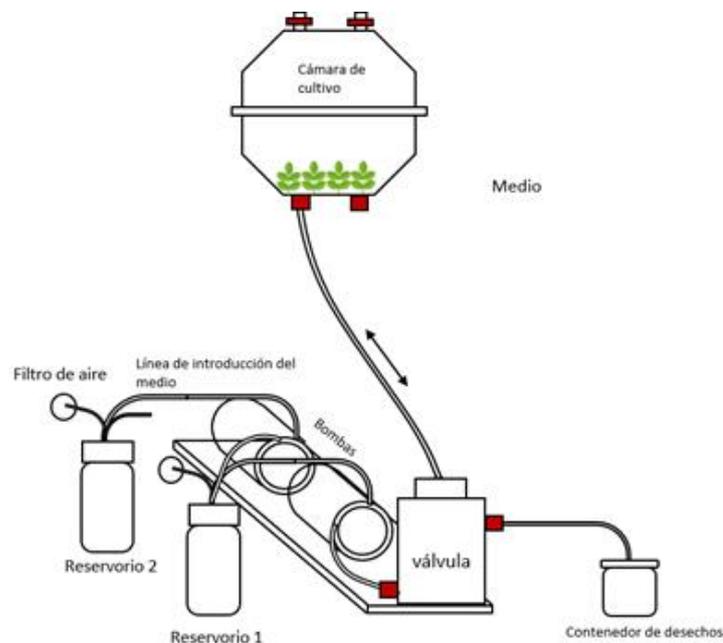


Figura 1. Representación de sistemas semiautomáticos de inmersión temporal: Sistema APCS con inmersión completa de material vegetal y renovación del medio de cultivo.

Adaptado de (Tisserat & Vandercook, 1985).

2.3.3. Sistemas con inmersión parcial y mecanismo de renovación de medio líquido

El material vegetal es colocado en un soporte para el cultivo, compuesto por agar, una pantalla de polipropileno y enchufes de celulosa. El medio de cultivo líquido es suministrado constantemente, para después ser retirado a un recipiente de drenaje, a fin de estabilizar la composición del medio de cultivo y alargar la duración de los subcultivos, posponiendo la necesidad de cambiar de medio. Adicionalmente, la base del material vegetal es la única que se encuentra sumergida en el medio (Etienne & Berthouly, 2002). De este diseño, se han publicado dos modelos: (i) Aitken-Christie & Davies (1998) y Aitken-Christie & Jones (1987) propusieron un modelo semiautomático compuesto por grandes envases de policarbonato que medían 2.5 x 3.9 x 1.2cm (Fig. 2A). En su diseño, se cultivaron brotes de *Pinus* en un medio compuesto por agar, con la adición automática y la liberación continua del medio de cultivo líquido gracias a la inclusión de bombas peristálticas. El medio de cultivo líquido entra en contacto con el material vegetal durante 4-6 horas, mediante un sistema de aspiración al vacío, y posteriormente, al recipiente de drenaje. Este diseño sigue lo establecido por Maene & Debergh, (1985), quienes demostraron que existía efectos positivos durante la adición de medio de cultivo líquido o auxinas en las etapas finales del cultivo *in vitro* (Etienne & Berthouly, 2002); (ii) Simonton, Robacker & Krueger, (1991) desarrollaron un sistema que comprendía un aparato de bombeo controlado por computador, el cual suministraba constantemente medio de cultivo líquido a los explantes depositados en un recipiente de 7 litros (Fig. 2B). Los explantes se encuentran reposando encima de una rampa de polipropileno perforada, adosada al interior del recipiente. Por otro lado, las funciones de control del sistema incluían la inyección de medio de cultivo, regulación de la profundidad dentro de los recipientes individuales, la frecuencia de inmersión, entre otros. En el estudio se usaron brotes de *Spathiphyllum* "Mauna Loa" para comparar el cultivo en frascos de vidrio con medio semi-sólido con el cultivo en medio líquido con inmersión parcial continua en el recipiente antes mencionado. Como resultado se obtuvo un aumento en el peso fresco y en el número de brotes

en el medio líquido en contraste con los medios semi-sólidos. Además, observaron que el efecto de la ventilación en el cultivo en medios semi-sólidos y medios líquidos fue relevante ya que aumento el peso total de los brotes ambos casos, lo cual se puede decir que la ventilación es un factor importante en el crecimiento *in vitro*.

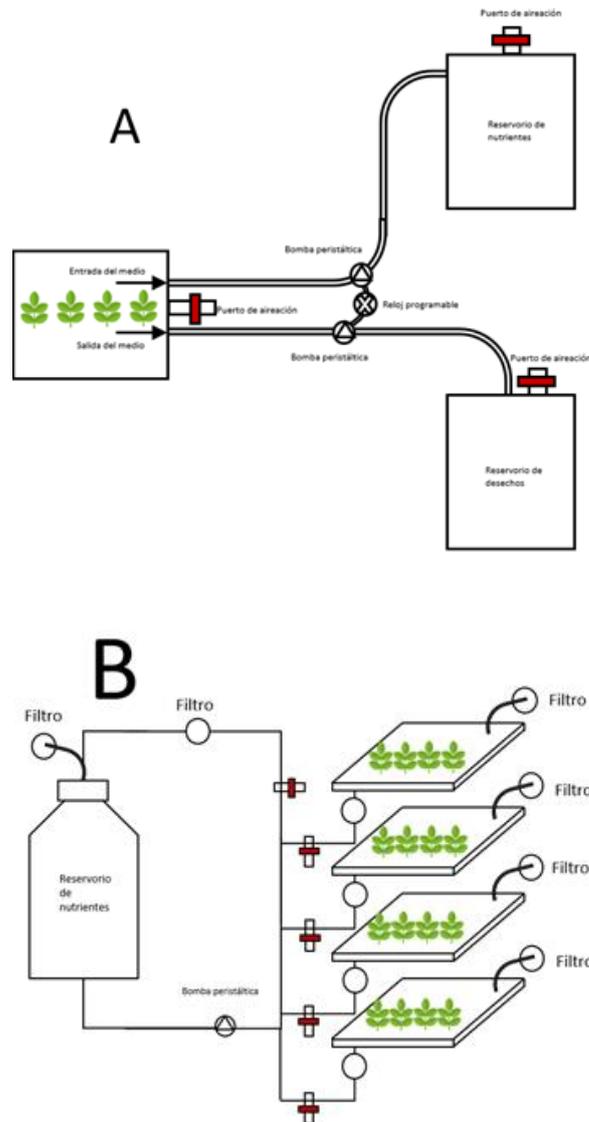


Figura 2. Representación esquemática de sistemas de inmersión temporal semi-automáticos con inmersión parcial y con un proceso de renovación de medio líquido.

Adaptado de (Simonton *et al.*, 1991)

A) A partir de Aitken-Christie & Davies, (1998)

B) A partir de Simonton *et al.* (1991).

2.3.4. Sistemas con inmersión completa por transferencia neumática de medio líquido y sin reposición del medio

Después de la publicación realizada por Alvard, Cote & Teisson (1993), diferentes sistemas de inmersión temporal fueron descritos. Estos son simples y mucho más fáciles de usar. Permiten el contacto de toda la superficie de los explantes con el medio de cultivo líquido, junto con una completa renovación de la atmósfera mediante ventilación forzada, la cual, adicionalmente, dirige el medio de cultivo líquido hacia el material vegetal. Estos sistemas pueden ser colocados en un recipiente a granel, suprimiendo la necesidad de incluirlos en un soporte. Por otro lado, permiten la transferencia neumática del medio de cultivo desde un tanque de almacenamiento a la cámara de cultivo, donde ambos recipientes muchas veces forman parte de un mismo envase. La presión es aplicada mediante una electroválvula, gracias a un compresor, por lo que es fácil determinar el tiempo y frecuencia de inmersión. Ya que estos sistemas no incluyen un tanque de medio de cultivo fresco, este tiene que ser renovado constantemente. Sin embargo, dicho reemplazo es rápido y no existe la necesidad de subcultivar los explantes (Etienne & Berthouly, 2002). Dos variantes de este sistema se han desarrollado:

2.3.4.1. El sistema RITA

El RITA (*Récepteur Immersion Temporaire Automatique*), distribuido por VITROPIC, ha sido diseñado para cultivos *in vitro* intensivos de plantas. Este sistema comprende un único recipiente de 500 mL de polipropileno esterilizable, junto con dos compartimentos separados por una malla que sirve de soporte y una tubería plástica ubicada en el centro (Fig. 3.). El sistema se encuentra cerrado por una ancha tapa de tornillo, equipada con puertos centrales y laterales ubicados en la parte superior. Ambos puertos se encuentran asegurados con filtros de membrana y el puerto central está conectado a una línea de distribución de aire, controlada por un temporizador y una válvula electromagnética de tres vías. La parte superior del recipiente de polipropileno actúa como la cámara de cultivo, mientras que la parte inferior actúa como el tanque de almacenamiento

del medio de cultivo. Las ventajas de este sistema comprenden la operación confiable y simple, el espacio compacto a disposición de los aparatos y el apoyo de un suficiente nivel de humedad relativa junto con la separación total de los explantes y el medio de cultivo; elementos interconectados, lo que permite una fácil manipulación. Sus principales desventajas son la dificultad para la renovación del medio de cultivo y la falta de opciones para la renovación de la atmósfera (Georgiev *et al.*, 2014).

El presente sistema fue empleado para la micropropagación de distintas especies vegetales como *Coffea*, *Hevea* y *Musa*, y a la vez probando diferentes métodos de multiplicación como embriogénesis somática, proliferación de meristemos y micro-cortes de explantes. Los resultados fueron favorables en cada especie y método empleado ya que se obtuvieron plantas de calidad en comparación con los métodos convencionales como medios semi-sólidos y líquidos. A partir de este estudio, concluyeron que la técnica de inmersión temporal puede reemplazar a los métodos convencionales y biorreactores costosos en el campo de la investigación como en el comercial (Teisson & Alvard, 1995).

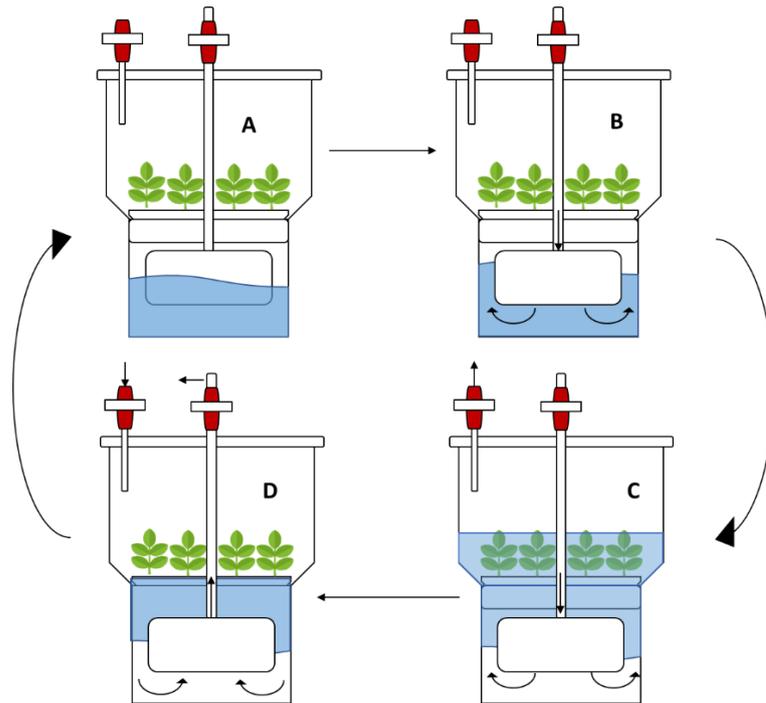


Figura 3. Principio de diseño y operación del sistema RITA.

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

(A) Período de exposición.

(B) Distribución del medio líquido. La presión del aire es aplicada al compartimiento inferior a través de la tubería central. El medio líquido se mueve hacia el compartimiento superior.

(C) Período de inmersión.

(D) Drenaje del medio nutriente. El flujo de aire se detiene y el medio vuelve al compartimiento inferior debido a la gravedad.

2.3.4.2. Sistema de frascos gemelos (*BIT*)

El sistema de frascos gemelos o de doble frasco (*Biorreactores de Inmersión Temporal*) es uno de los primeros sistemas de inmersión temporal desarrollados (Escalona *et al.*, 1999; Lyam *et al.*, 2012; Paula, 2012). Este sistema comprende dos envases de boca ancha, tarros o botellas, conectados entre sí mediante una tubería en forma de U, la cual puede ser de plástico o vidrio, o un tubo de silicona (Aragón *et al.*, 2010; Niemenak, Saare-Surminski, Rohsius, Ndoumou, & Lieberei, 2008; Sankar-Thomas & Lieberei, 2011; Scherer, Garcia, de Freitas Fraga, Dal Vesco, Steinmacher & Guerra, 2013; Schumann *et al.*, 2012; Yan,

Liang & Li, 2010; Yang *et al.*, 2010). Uno de los contenedores actúa como cámara de cultivo y el otro contenedor es empleado como tanque de almacenamiento para el medio de cultivo (Fig. 4.). El envase que actúa como cámara de cultivo puede o no, ser equipado con un material de soporte para el material vegetal en la parte inferior, como metal, poliuretano, cristal, entre otros (Arencibia *et al.*, 2013; Ashraf, Aziz, Stanslas & Kadir, 2013; Quiala *et al.*, 2012; Sankar-Thomas, Saare-Surminski & Lieberei, 2008; Scherer, Garcia, de Freitas Fraga, Dal Vesco, Steinmacher & Guerra, 2013; Steinmacher, Guerra, Saare-Surminski, & Lieberei, 2011; Teisson & Alvard, 1999; Yang *et al.*, 2010). En cada envase se halla su propia línea de aire presurizado, el cual es controlado por temporizadores que se hallan acoplados con electroválvulas de tres vías. Debido a que el sistema posee un diseño simple, lo hace ideal para muchos laboratorios. Usualmente son fáciles de operar, y su construcción puede mantener los ambientes estériles para largos períodos de cultivo (Arencibia *et al.*, 2013). Varias de las principales desventajas de este sistema son la automatización, ya que dependen de dos temporizadores y de válvulas electromagnéticas, y la ausencia de opciones para la renovación del medio de cultivo y atmósferas (Georgiev *et al.*, 2014). Por otro lado, estos sistemas no se encuentran equipados con un puerto destinado al suministro externo durante el periodo de exposición, por lo que el CO₂ puede ser empleado para asegurar concentraciones más altas de este en la atmósfera de la cámara de cultivo (Arencibia *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2010). Los sistemas BIT han sido empleados exitosamente para la micropropagación de plántulas, embriones, nódulos, entre otros de especies vegetales como *Theobroma cacao* L., *Tectona grandis*, *Ananas comosus* Var. *Comosus*, *Bactris gasipaes* y *Solanum lycopersicum* (Niemenak *et al.*, 2008; Quiala *et al.*, 2012; Scherer, Garcia, de Freitas Fraga, Dal Vesco, Steinmacher & Guerra, 2013; Steinmacher *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2010).

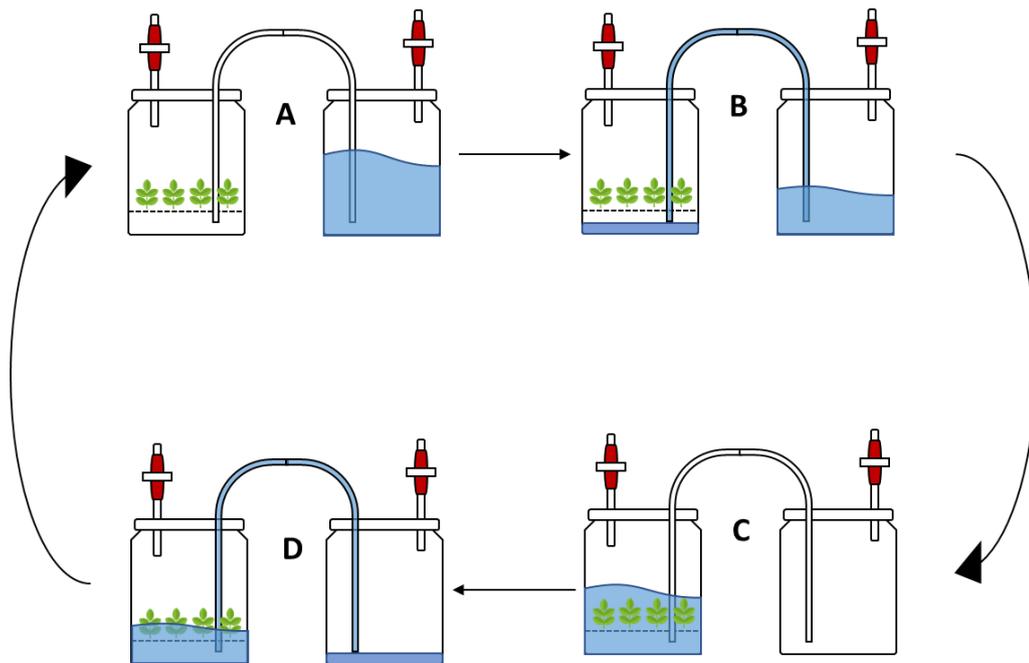


Figura 4. Diseño y principio operacional del Sistema de Frascos Gemelos.

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

(A) Período de exposición. Todo el volumen del medio líquido se encuentra en el tanque de almacenamiento del medio.

(B) Distribución del medio líquido del tanque de almacenamiento del medio a la cámara cultivo..

(C) Período de inmersión. Los propágulos se sumergen en el medio líquido. El tanque de almacenamiento del medio está vacío. Las líneas de aire para ambos recipientes están cerradas y las electroválvulas se abren a la atmósfera.

(D) Drenando el medio nutricional de nuevo al tanque del medio de cultivo. La línea de aire de la cámara de cultivo es abierta, mientras que la línea de aire del tanque de almacenaje del medio está cerrada. La sobrepresión mueve hacia atrás el medio en el tanque de almacenamiento del medio.

2.3.5 SITs Varios

2.3.5.1. Thermo-foto-biorreactor SIT

Este sistema de inmersión temporal ha sido diseñado específicamente para la producción de metabolitos secundarios y micropropagación de *Deschampsia antarctica* E. Desv. (Navarro *et al.*, 2013). El sistema comprende dos recipientes

de cristal interconectados por tubos de acero inoxidable (Fig. 5.). El envase superior actúa como la cámara de cultivo, equipada con una chaqueta de agua, destinada al control de la temperatura, junto con una fuente de luz ultravioleta, ubicada en la tapa superior. Los explantes son ubicados en una placa de acero inoxidable ubicada dentro de la cámara de cultivo. Por otra parte, el envase inferior es el tanque de almacenamiento del medio de cultivo líquido. El diseño incluye dos puertos externos, uno destinado al suministro de aire, y, por tanto, ubicado en la cámara superior, mientras que el otro, empleado para la administración del medio de cultivo, ubicado en el tanque de almacenamiento. (Georgiev *et al.*, 2014). Las principales ventajas de este sistema son la radiación ultravioleta y el control de la temperatura (Sequeira *et al.*, 2012). Sin embargo, las principales desventajas de este sistema son la construcción costosa y compleja, razón por la cual se han desarrollado variantes de menor costo, ya que utilizan botellas de vidrio (Rodrigues, Teixeira, Lima, & Ambrosano, 2006) o sistemas de filtración NALGENE (Stanly, Bhatt, & Keng, 2010), los cuales, no poseen el control exacto de la temperatura como el sistema original (Georgiev *et al.*, 2014).

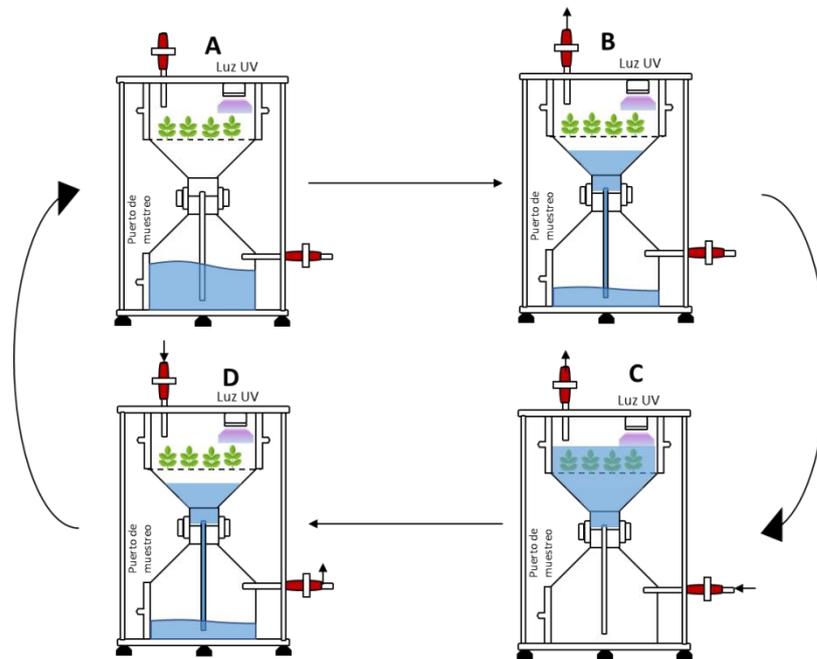


Figura 5. Diseño tecnológico y principio operacional del termo-foto-biorreactor.

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

(A) Período de exposición.

(B) Distribución del medio líquido. El aire se suministra al tanque de almacenaje del medio y el medio se está moviendo a la cámara de cultivo.

(C) Período de inmersión.

(D) Drenando el medio nutritivo. El suministro de aire se detiene y el medio fue drenado hacia atrás por la gravedad.

2.3.5.2. Sistema de flujo híbrido-convectivo tubular saturado

Este sistema se desarrolló exclusivamente para el cultivo *in vitro* de especies vegetales con raíces que poseen una alta densidad de vellosidades como *Hyoscyamus muticus* (Cuello & Yue, 2008). Este sistema de inmersión temporal es un biorreactor híbrido, que, durante los primeros días de operación, post-inoculación, actúa como una columna de burbujas y después cambia de operación a la de un sistema de frascos gemelos (Fig. 6.) (Georgiev *et al.*, 2014). La primera operación resulta necesaria a fin de asegurar la distribución uniforme e inmovilización de las raíces. Así, una vez que estas están unidas a la malla interna, el sistema comienza a funcionar como un sistema de frascos gemelos. Adicionalmente, una bomba peristáltica se encarga de la distribución del medio

de cultivo líquido, desde el tanque de almacenamiento, hacia la cámara de cultivo. Este sistema funciona con cortos tiempos de inmersión (2 minutos por cada uno) y la velocidad a la que funciona la bomba peristáltica es determinada, a fin de asegurar una completa distribución del medio de cultivo, con lo que es fácil lograr un flujo convectivo tubular (Cuello & Yue, 2008). Adicionalmente, el medio de cultivo es presaturado con aire, a fin de suministrar oxígeno a zonas muy internas de las raíces que se encuentran en desarrollo. Las principales ventajas de este sistema reside en la mejorada transferencia de oxígeno y producción de metabolitos secundarios, mientras que sus principales desventajas son su complejo diseño y operación, exclusividad para cultivos radiculares y difícil recolección de la biomasa de las raíces inmovilizadas (Georgiev *et al.*, 2014).

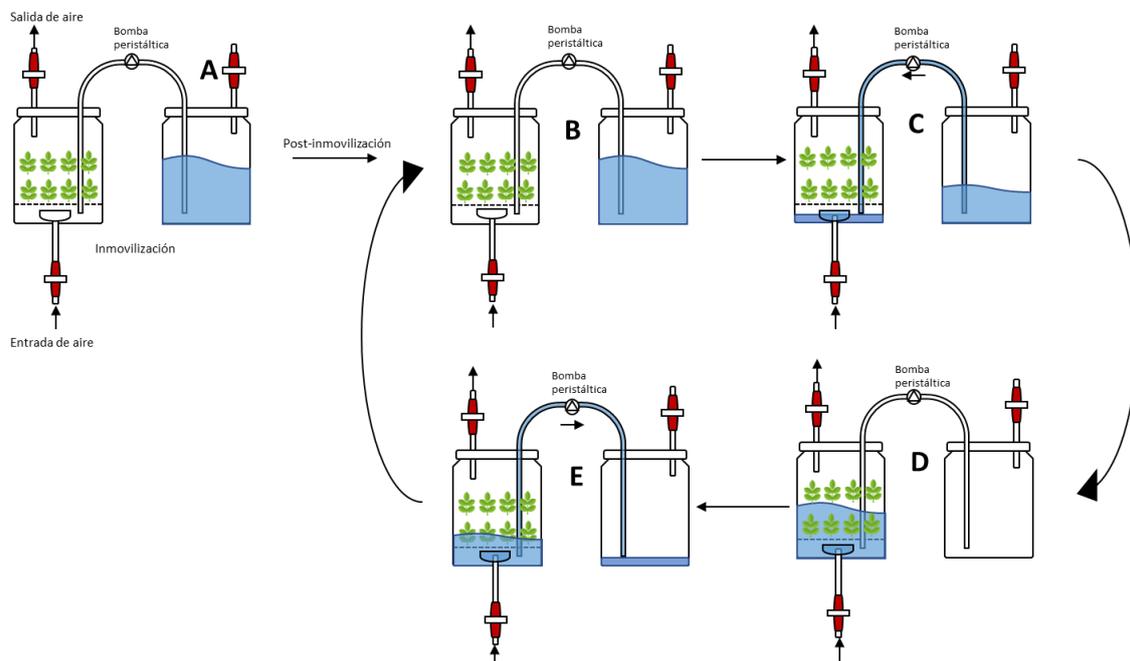


Figura 6. Diseño tecnológico y principio operacional del Sistema de flujo híbrido-convectivo tubular saturado.

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

(A) Operación en columna de burbujas hasta que se logre la distribución uniforme y la inmovilización de las raíces pilosas transformadas.

(B – E) Operación en modo de inmersión temporal similar a la del sistema de dos frascos.

2.3.5.3. Biorreactor De Inmersión Por Burbujas (BIB)

El *Biorreactor de Imersão por Bolhas* o Biorreactor de Inmersión por Burbujas, emplea una estrategia de cultivo diferente a la que se ha venido describiendo, ya que se basa en la inmersión temporal del material vegetal empleando espuma, en lugar de medio líquido. Este sistema comprende un cilindro de vidrio que se encuentra dividido transversalmente en dos compartimentos gracias a una placa microporosa, con poros de 170-220 μm (Fig. 7.) (Georgiev *et al.*, 2014). La parte superior que comprende uno o varios compartimentos actúan como cámaras de crecimiento, delimitados por armazones de acero inoxidable que se han apilado uno sobre el otro a fin de estibar el cultivo del material vegetal. Se ha agregado Tween20 al medio de cultivo líquido, el cual es rellenado en la parte inferior del recipiente cilíndrico, actuando como tanque de almacenamiento, por lo que existe una distribución uniforme del aire a través de la placa porosa. Este sistema se encuentra disponible a una escala de 1.5L, e investigaciones recientes han demostrado que ha logrado generar un mayor número de brotes y un mejor crecimiento frente a sistemas como el RITA, en la micropropagación de *Malaleuca alternifolia* y *Oncidium leucochilum* (Scheidt, Silva, Oliveira, Costa, Biasi, & Soccol, 2011). Sin embargo, la inclusión de detergente en el medio de cultivo, junto con largos periodos de drenaje, pueden restringir la aplicación de este sistema para la micropropagación de algunas especies vegetales sensibles (Georgiev *et al.*, 2014; Steingroewer *et al.*, 2013).

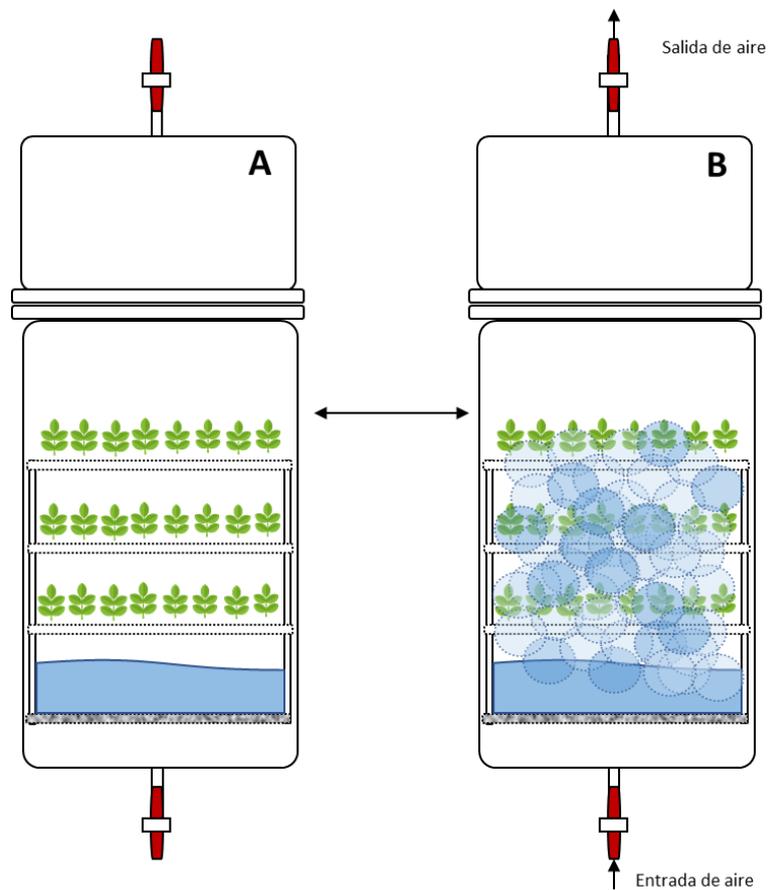


Figura 7. Diseño tecnológico y principio operacional del biorreactor de inmersión por sistema de burbujas.

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

(A) Período de exposición.

(B) Período de inmersión. Se suministra aire y se forma espuma. Los explantes son sumergidos en un medio de cultivo en forma de burbujas. Cuando la aireación se detiene, la densidad de la espuma disminuye con el tiempo debido al drenaje líquido y los explantes se exponen a un ambiente gaseoso.

2.3.5.4. Sistemas de Balancín

Los sistemas basados en un balancín emplean una plataforma mecánicamente hábil, destinada a inclinar los tanques o cajas de cultivo en un ángulo determinado, de tal forma que el medio de cultivo pueda ser distribuido desde un extremo de la caja al otro, y viceversa (Fig. 8A. y 8B.) (Georgiev *et al.*, 2014). Generalmente, las cajas de cultivo están fabricadas en policarbonato autoclavable, con forma rectangular de una abertura lateral ancha, cerradas por

una tapa de tornillo ancha que posee un filtro de membrana (Georgiev *et al.*, 2014). Así, post-inoculación, las cajas de cultivo son colocadas en bastidores con los estantes mecánicamente activados, donde las inclinaciones de estos crean ondas pequeñas, por lo que alternadamente sumergen y airean al material vegetal. Se ha probado en especies vegetales como *Caladium*, *Solanum tuberosum* y *Panax quinquefolius* L. (Adelberg & Toler, 2004; Kämäräinen-Karppinen, Virtanen, Rokka & Pirttilä, 2010; Uchendu, Paliyath, Brown & Saxena, 2011). La principal ventaja de este sistema es que un gran número de cajas de cultivo pueden ser acomodadas en la estantería, sin ninguna conexión adicional necesaria. Las desventajas están relacionadas con la necesidad de inclinar la plataforma mecánica, aumentando los costos de funcionamiento. Por otro lado, este tipo de sistemas requieren de un gran espacio para funcionar adecuadamente, lo que puede influir sobre el costo de producción. De igual forma, las cajas de cultivo no poseen una adecuada renovación de atmósfera y tampoco existen opciones para renovar el medio de cultivo líquido (Georgiev *et al.*, 2014). Estos problemas pueden ser solucionados empleando sistemas como los Biorreactores BIOMINT (Figura 8C. y 8D.), biorreactores de tamaño medio, los que comprenden dos recipientes cilíndricos de policarbonato unidos mediante un adaptador. Así, uno de los compartimentos actúa como cámara de cultivo, mientras que el otro es el tanque de almacenamiento del medio de cultivo. El adaptador que se encuentra perforado permite el flujo del medio líquido, mientras que los explantes se mantienen en su lugar cuando el biorreactor cambia de posición. Adicionalmente, el adaptador posee dos puertos externos que permiten la renovación de la atmósfera, enriquecida con CO₂ (Robert, Herrera-Herrera, Herrera-Herrera, Herrera & Fuentes-Carrillo, 2006). Gracias a su flexible y fácil construcción, estos biorreactores son ideales para la micropropagación (Bello-Bello *et al.*, 2010; Peña-Ramírez *et al.*, 2010).

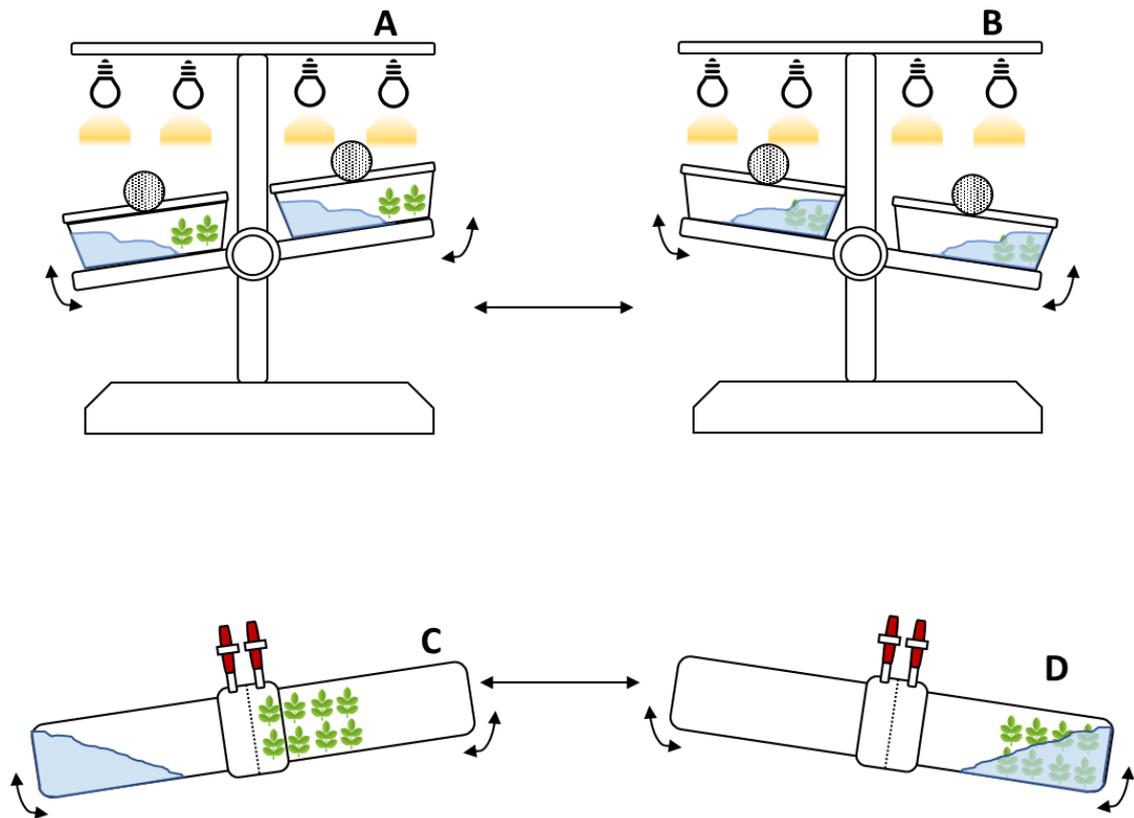


Figura 8. Diseño tecnológico y principio operacional de (A, B) Rocker SIT y (C, D) biorreactor Biomint.

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

2.3.5.5. Sistema giratorio del tambor

Este sistema comprende un aparato de rodillos junto con una botella de vidrio o de plástico autoclavable (Fig. 9.). Dentro de cada una de las botellas se coloca una red de acero inoxidable o una cama de espuma de poliuretano que brinda apoyo al material vegetal, el cual fue, en el estudio de Akita & Ohta, (1998), *Solanum tuberosum*. Cuando el sistema de rodillos se encuentra girando a bajas velocidades, los explantes inmovilizados son sumergidos y aireados constantemente. La ventaja de este sistema es su simple construcción. Por otro lado, las principales desventajas de este sistemas son su incapacidad para determinar largos tiempos independientes para la inmersión y períodos de exposición; falta de opciones para la ventilación e intercambio atmosférico, así

como también una mayor fuerza de cizalla gracias a la mezcla mecánica (Reis *et al.*, 2011).

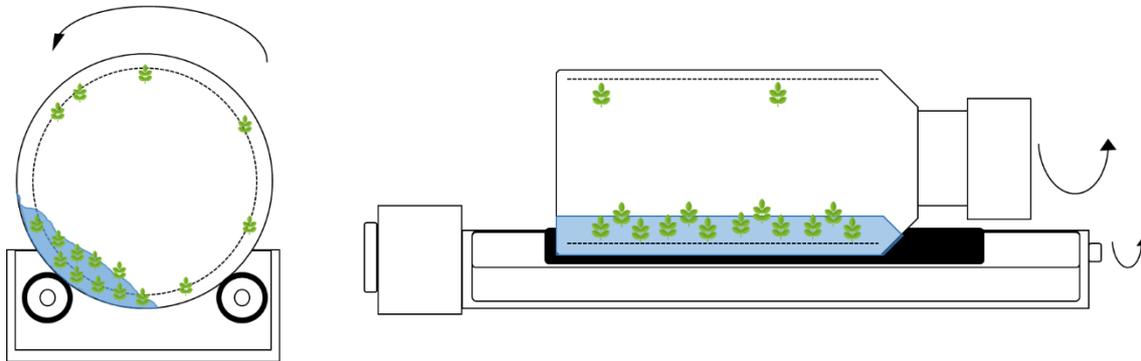


Figura 9. Diseño tecnológico y principio operacional de rotar sistema del biorreactor del tambor.

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

2.3.6 SITs desechables y de bajo costo

A fin de reducir los costos de inversión de producción y fabricación destinados para el equipamiento, ahorrar espacio y mano de obra, se han desarrollado, durante los últimos años, varios sistemas de inmersión temporal desechable y de bajo costo (Fig. 10A-F). Una de las principales características de este tipo de sistemas es su diseño simple y barato, el cual viene acompañado de elementos plásticos intercambiables. Estos sistemas poseen un fácil manejo, su almacenamiento es complejo, son autoclavables y permiten un uso múltiple (Georgiev *et al.*, 2014). Algunos sistemas de inmersión temporal desechables son los biorreactores RALM, los cuales operan empleando el principio de los frascos gemelos; el sistema SETIS, que opera similarmente al sistema de flujo y reflujo; el sistema PLANTIMA, que opera empleando el principio del RITA y ha sido empleado para la micropropagación de *Siraitia grosvenorii*, *Dioscorea fordii* y *Dioscorea alata* (Yan *et al.*, 2010; Yan, Litao & Li, 2013). Otros sistema de este tipo es el biorreactor PLANTFORM; el sistema Box-in-bag, un sistema desechable que opera bajo el principio del sistema de inmersión temporal de flujo y reflujo; y el biorreactor WAVE, que comprende un sistema de balancín, que

utiliza bolsas de cultivo preesterilizadas (Eibl & Eibl, 2008; Eibl & Eibl, 2006; Eibl, Werner, & Eibl, 2009).

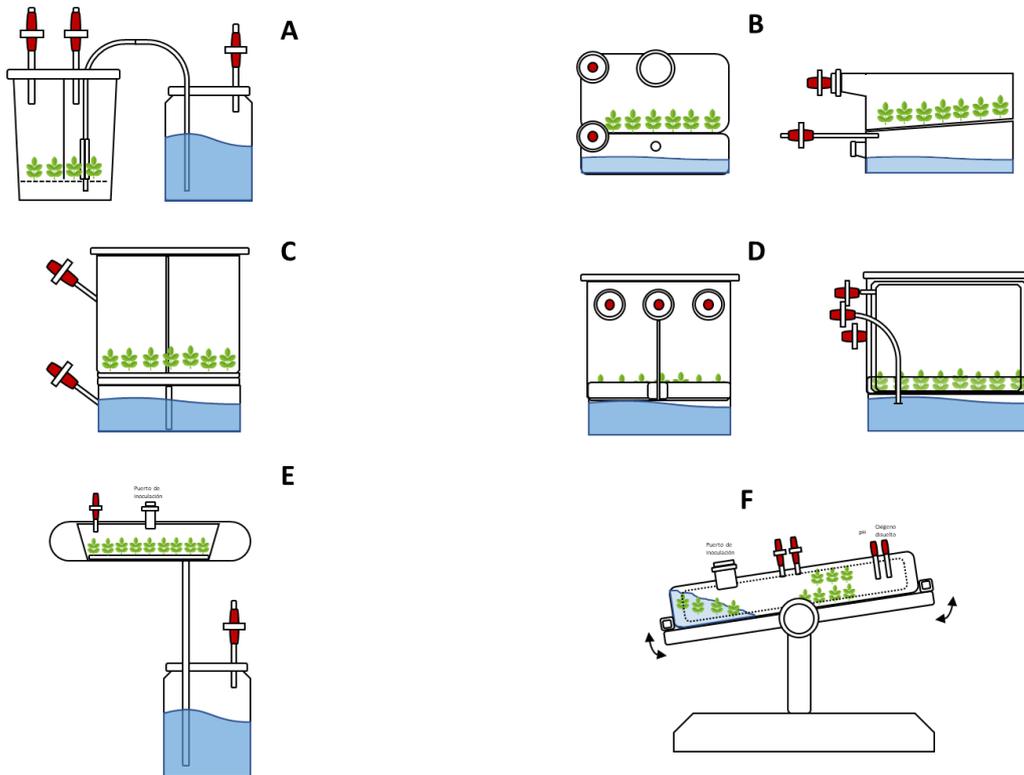


Figura 10. Diseño tecnológico de (A) RALM biorreactor, (B) SETIS sistema de biorreactores de inmersión temporal, (C) sistema PLANTIMA, (D) PLANTFORM biorreactor, (E) caja en bolsa, y (F) biorreactor de onda

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

2.4. Diseño y construcción de Sistemas de Inmersión Temporal (SIT)

El diseño de los SIT comprende una actividad de ingeniería compleja por los distintos requerimientos a considerar como intercambio gaseoso, volumen de medio nutriente líquido, capacidad del recipiente, restitución del medio nutriente, tiempo y frecuencia de inmersión, además del monitoreo de parámetros como pH, CO₂, O₂, temperatura y presión interna, con la finalidad de tener un medio ideal para un desarrollo rápido y eficiente de las plantas (Gómez, 2006).

Por otro lado, los materiales que serán utilizados para la construcción de los SIT cumplen un papel fundamental, ya que deben cumplir ciertos aspectos como resistencia al calor, en caso de que la esterilización sea con autoclave, durabilidad, transparencia en ciertos casos y sobre todo económicos, como es en el caso del trabajo de Rosales Maldonado, Rodríguez De Francisco, & Gómez Alvarado, (2003), en el cual tratando de disminuir el alto costo que conlleva la adquisición de un SIT comercial, construyeron un equipo con componentes que se pueden obtener en el comercio local. Sencillamente, el sistema consta de dos recipientes de vidrio en forma cilíndrica de 250 mL, los cuales llevarán un tapón de hule con dos orificios de 5 mm de diámetro, en los que se meterán dos tubos de vidrio de igual diámetro. El diseño se semejaba al Sistema de Inmersión Temporal de Frascos Gemelos (BIT) con un sistema de control de tiempo y frecuencia de inmersión. El funcionamiento del mismo fue puesto a prueba durante un lapso de dos meses sin ninguna falla, además de que la inversión para la construcción del prototipo y el sistema de control fue de \$489,90 aproximadamente, siendo un valor competitivo contra los SIT que se hallan en el mercado.

En otro estudio realizado por Gómez, (2006), se diseñó y construyó un prototipo de Biorreactor de Inmersión Temporal semejante al Sistema RITA (Figura.11), en el cual emplearon dos frascos de vidrio tipo PYREX (superior e inferior) por su utilidad, resistencia a cambios bruscos de temperatura y por ser cristalino, permitiendo el paso de la luz para el proceso fotosintético de las plantas. Y para el soporte central se usó aluminio Al-6063, mangueras de caucho para el transporte del medio y los filtros fueron diseñados a la medida y elaborados de

una mezcla de carbón. Como resultado se obtuvo un aumento en el crecimiento de brotes a partir de callos de *Musa AAA* en el prototipo en comparación con el medio semi-sólido.

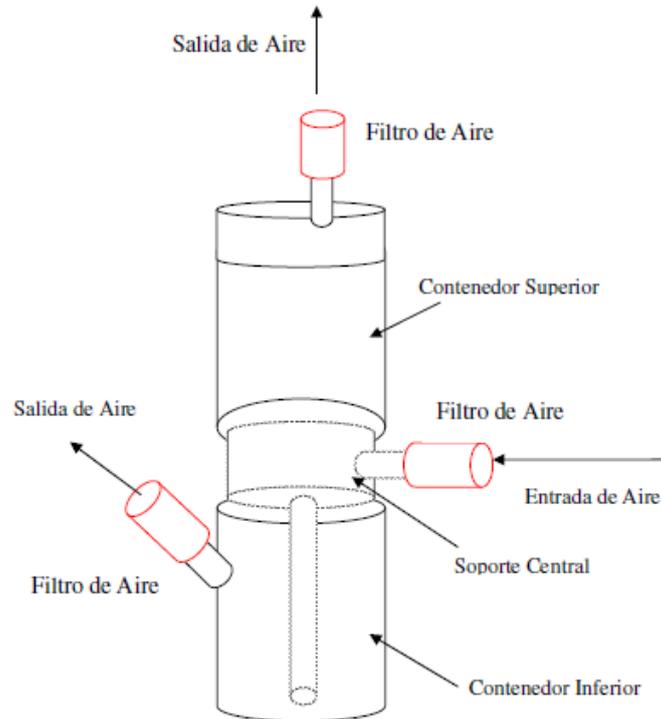


Figura.11 Prototipo de un Biorreactor de Inmersión Temporal

Tomado de (Gómez, 2006)

La finalidad de los estudios anteriores es brindar una alternativa económica y eficiente para la micropropagación de distintas especies vegetales empleando materiales de fácil adquisición y baratos, de tal forma, compiten con el mercado actual de los SIT y permite la implementación de esta tecnología en países que se hallan en vías de desarrollo.

3. Capítulo III. Metodología

3.1. Diseño y construcción del SIT propuesto

3.1.1. Diseño

El diseño se realizó en el software AutoCAD®, el cual fue empleado para el dibujo y modelado de las piezas. El diseño exacto de las mismas se mantiene en reserva por temas de propiedad intelectual.

3.1.2. Construcción

La construcción del prototipo fue realizada en base al modelado previamente con la utilización de impresión 3D para ciertas piezas. El material y ensamblaje del SIT se mantiene en reserva por temas de propiedad intelectual.

3.2. Validación del SIT propuesto

3.2.1. Obtención del material de partida

Se obtuvieron brotes de tabaco con la finalidad de realizar multiplicación axilar. Se utilizó medio MS basal destinado al establecimiento del material vegetal. A continuación, empleando MS basal modificado, tal y como se observa en la Tabla 3, se generaron brotes.

Tabla 3.

Formulación de los medios MS modificado con fitohormonas para la multiplicación de brotes de N. tabacum.

Compuesto	Cantidad por L
Macroelementos 1X	100 mL
Microelementos 1X	10 mL
Hierro 1X	10 mL
6-BAP	2 ml
ANA	200 µl
Agar	7 g
Sacarosa	30 g

Adaptado de (Ali, Hadi, Ali, Tariq & Khan, 2007)

3.2.2. Diseño experimental

Se establecieron 3 tratamientos para comparar la efectividad del sistema de inmersión temporal con respecto al cultivo convencional en medio semisólido. Los tratamientos establecidos están descritos en la Tabla 4. Las variables de respuesta que se escogieron fueron el número de hojas y brotes de los explantes, longitud de las hojas y la tasa de multiplicación de los brotes después de 17 días, la cual fue determinada mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Tasa de multiplicación} = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de brotes} - \text{N}^\circ \text{ de brotes al inicio}}{\text{Tiempo final} - \text{Tiempo inicial}}$$

(Ecuación 1)

Tabla 4.

Tratamientos para multiplicación de brotes de N. tabacum en medio semi-sólido y SIT propuesto

Tratamiento	Medio
MS-AGAR	MS basal + agar
MSFITO-AGAR	MS basal + agar + 6-BAP (2 mg/L) + ANA (0,2 mg/L)
MS-LIQ	MS basal
MSFITO-LIQ	MS basal + 6-BAP (2 mg/L) + ANA (0,2 mg/L)

Se cultivaron 3 brotes axilares de *N. tabacum* en cada recipiente que contenía medio semi-sólido y 10 brotes axilares en el Sistema de Inmersión Temporal. Para este último, se definió un tiempo y frecuencia de inmersión estándar de 1 minuto cada 6 horas, tiempo en el cual las yemas fueron sumergidas. Los tratamientos se cultivaron con un fotoperiodo que incluía 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. El experimento se realizó por duplicado.

3.3. Evaluación estadística de los resultados

Una vez que se obtuvieron los datos, se realizó el análisis estadístico ANOVA univariado, para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos realizados en la validación del SIT, además de una prueba de contraste de medias de Duncan para hallar si las medias entre los tratamientos son significativamente diferentes. Este análisis fue realizado en SPSS V.25.

3.4. Diagrama de flujo del proceso

En la Figura 12. se observa el diagrama de flujo del proceso a seguir a lo largo de la investigación.

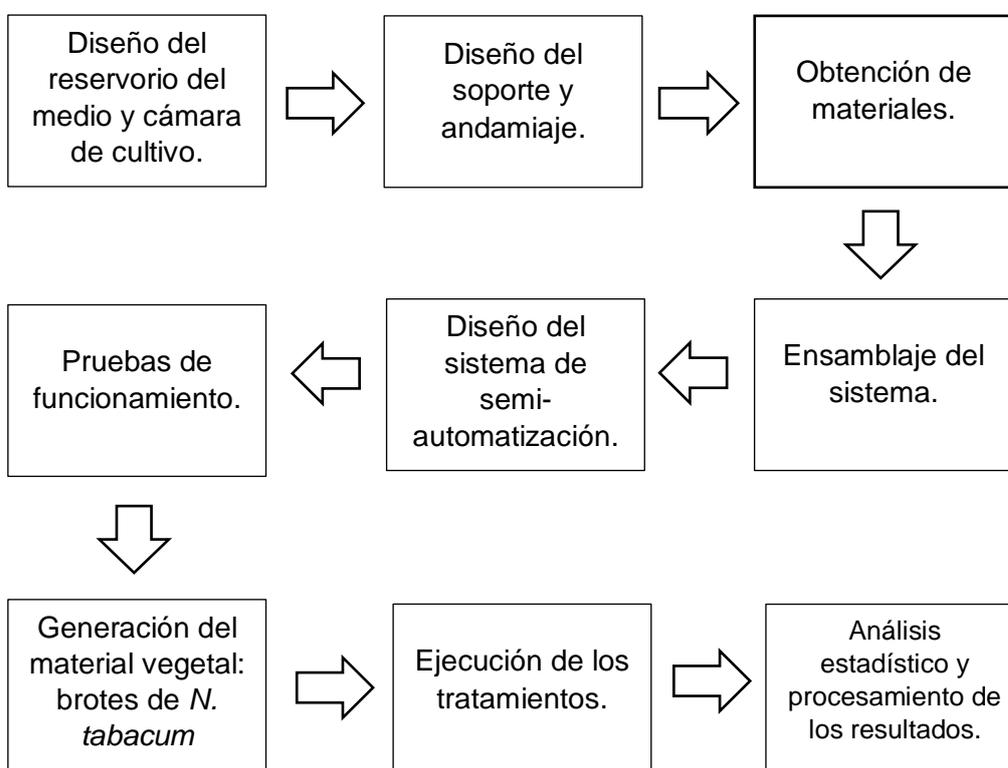


Figura 12. Diagrama de flujo del diseño y desarrollo de un prototipo de Sistema de Inmersión Temporal semi-automatizado para la micropropagación masal vegetal.

4. Capítulo IV. Resultados y discusión

4.1 Validación del SIT propuesto

En la presente etapa se validó el sistema con brotes de *N. tabacum* en medios de cultivo con distintas formulaciones y fue comparado con el método convencional de micropropagación realizado en medios semisólidos durante 17 días (Figura 13). Se observa un aumento significativo en el número de brotes y hojas en el SIT, en comparación con los medios semisólidos. El mayor de número de brotes y hojas se encuentra en el tratamiento con medio líquido MS suplementado con fitohormonas del SIT, siendo estos valores: $14 \pm 1,05$ brotes y $10 \pm 0,82$ hojas (Figura 14). Por otra parte, el medio semisólido MS basal presentó el menor número de brotes y hojas siendo estos de $4,4 \pm 0,7$ brotes y $4,2 \pm 0,78$ hojas (Figura 15.) El análisis estadístico ANOVA determinó que existieron diferencias significativas entre los tratamientos y la prueba de Duncan estableció que las medias entre las variables dependientes fueron significativamente diferentes. Esto quiere decir que el SIT desarrollado ofrece mejores resultados que los obtenidos en los medios semisólidos.

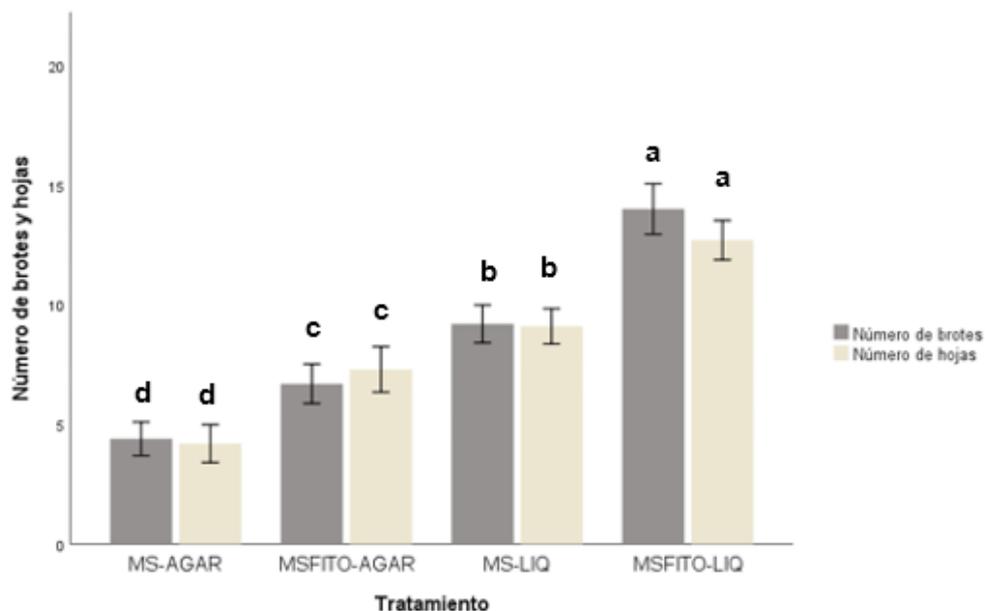


Figura 13. Número de brotes y hojas en el SIT y medios semisólidos de los tratamientos planteados.

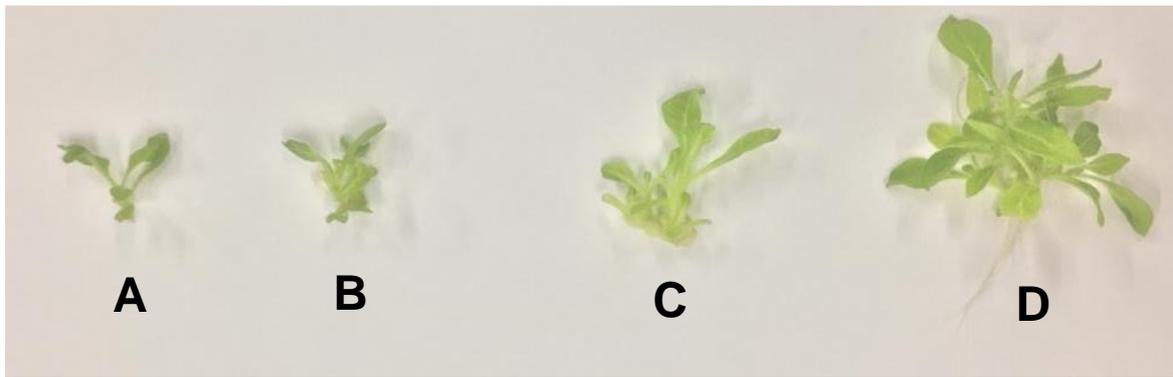


Figura 14. Explantes obtenidos en medios semisólidos y en el SIT.

(A) MS-AGAR

(B) MSFITO-AGAR

(C) MS-LIQ

(D) MSFITO-LIQ

Cabe recalcar que en todos los tratamientos realizados en el SIT y en los medios semisólidos, no hubo contaminación bacteriana ni fúngica, debido a que el manejo del material antes y durante el cultivo fue realizado en condiciones asépticas.

En cuanto a la tasa de multiplicación, se observa que la mayor tasa fue en el SIT con medio MS suplementado con 6-BAP y ANA (Figura 15), dando como resultado la generación de $0,81 \pm 0,06$ brotes/día. Mientras que en el medio semisólido MS basal obtuvo la menor tasa de multiplicación de $0,21 \pm 0,04$ brotes/día. Por lo tanto, el mejor tratamiento es el medio líquido MS con 6-BAP y ANA en el SIT en comparación a los demás tratamientos. El análisis estadístico ANOVA determinó que existieron diferencias significativas entre los tratamientos y la prueba de Duncan estableció que las medias entre las variables dependientes fueron significativamente diferentes. Esto quiere decir que el SIT desarrollado ofrece mejores resultados que los obtenidos en los medios semisólidos.

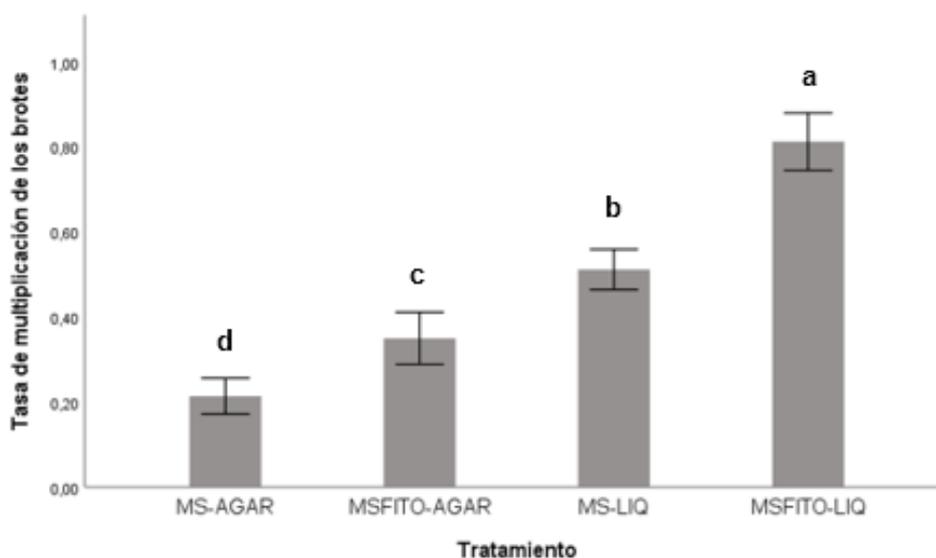


Figura 15. Comparación de la tasa de multiplicación en los medios semisólidos y en el SIT propuesto.

En cuanto a la longitud de la hoja, la mayor se obtuvo en el tratamiento con medio MS líquido suplementado con fitohormonas del SIT (Figura 16), siendo este valor

de $1,94 \pm 0,23$ cm. Mientras que en los medios semisólidos con MS basal se presentó la menor longitud de hojas, siendo el valor de $0,64 \pm 0,06$ cm. El análisis estadístico ANOVA determinó que existieron diferencias significativas entre los tratamientos y la prueba de Duncan estableció que las medias entre las variables dependientes fueron significativamente diferentes. Esto quiere decir que el SIT desarrollado ofrece mejores resultados que los obtenidos en los medios semisólidos.

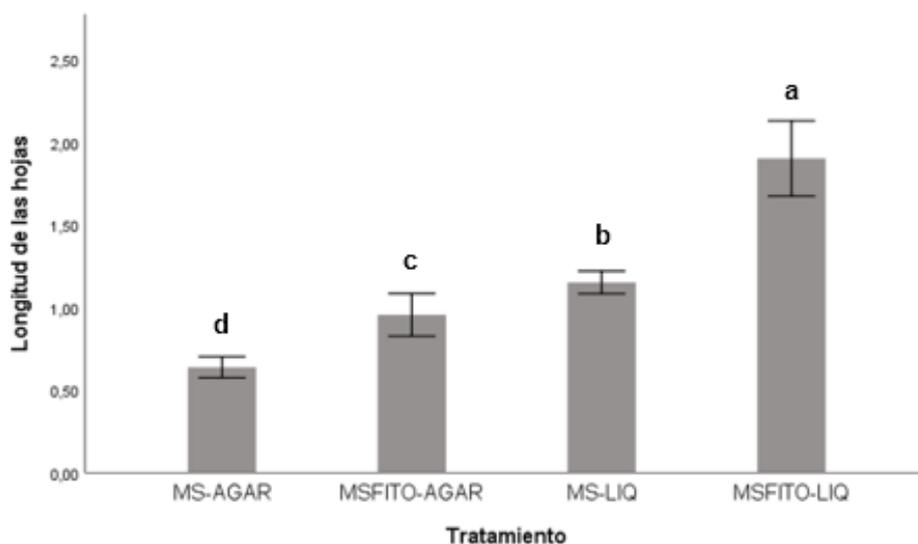


Figura 16. Longitud promedio de las hojas de los tratamientos planteados.

Estos resultados concuerdan con lo obtenido en otras especies vegetales de importancia. En Escalona *et al.* (1999) compararon la efectividad de un SIT, al que denominaron Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT) o Sistema de Frascos gemelos, para micropropagar *Ananas comosus* L. Merr, frente a la micropropagación realizada en medios semisólidos y líquidos; donde determinaron que los explantes cultivados en el SIT presentaron la tasa de multiplicación más alta de todos los sistemas de propagación evaluados. Así, las tasas de multiplicación presentaron un incremento del 300 y 400% frente al modelo líquido y semisólido respectivamente, lo cual se observó en el presente estudio, donde la tasa de multiplicación presentó un aumento del 242,8% en aquellos medios sin fitohormonas y del 385,7% en los medios con fitohormonas en 17 días de tratamiento. Por otro lado, los autores describen que existe un

incremento considerable en relación al peso fresco, correlacionado con la proliferación de brotes, y, a pesar de que en el presente estudio, no se utiliza al peso fresco como una variable de respuesta, podemos deducir que las diferencias en la generación de brotes y en consecuencia hojas a partir de los mismos, darían como lugar un mayor peso fresco en aquellos explantes cultivados en los SITs, frente a aquellos en relación al medio semisólido, describiendo un patrón similar al de la Figura 13. Por otro lado, los autores señalan que no existe una diferencia significativa en relación al peso seco, otra de las variables no analizadas en el presente estudio, debido a que las hojas generadas en el SIT, a partir de los brotes axilares son pequeñas y son generadas a partir de una región central, dando lugar a que no haya un incremento en el peso seco, haciendo que el material vegetal no sea adecuado para las etapas de enraizamiento y posterior aclimatación. Esto claramente no se observó en los cultivos llevados a cabo en el SIT diseñado, donde, tal y como se observa en la Figura 14, las hojas presentan una adecuada morfología y tamaño, lo cual supondría que el material vegetal generado podría ser apto para las siguientes etapas de propagación, para lo cual es ideal recalcar que el mismo SIT propuesto no requiere de alguna adecuación de diseño para permitir un correcto enraizamiento, por lo que suponemos que se facilitaría la obtención de una gran cantidad de material vegetal.

Tomando en cuenta el principio de funcionamiento del sistema propuesto, en relación al de los autores, quienes emplearon el bombeo del medio de cultivo hacia el material vegetal, una de las posibles causas de la generación de hojas de pequeño tamaño, dado por el estrés generado sobre el tejido vegetal debido a las constantes fuerzas de cizalla al recibir el medio de cultivo, frente a los resultados obtenidos en el presente estudio empleando este nuevo diseño, que supone la desaparición o reducción significativa de dichas fuerzas y en consecuencia, estrés sobre el tejido. Barretto, Michoux, Hellgardt & Nixon (2017) describieron el efecto hidrodinámico de las fuerzas de cizalla generadas por el bombeo del medio de cultivo hacia el material vegetal, en la generación de callos de *N. tabacum* en un SIT, demostrando que, el incremento de la tasa de aireación y en consecuencia, el aumento de las fuerzas de cizalla disminuyeron en 50% el

crecimiento de la biomasa fresca en cultivos de 20 días, junto con daño celular significativo para los cultivos de 20 y 40 días, indicado por una acumulación de biomasa reducida, actividad mitocondrial comprometida y desarrollo inadecuado de cloroplastos, influyendo en el nivel de expresión de proteínas. Es por esta razón que el sistema desarrollado en este estudio podría generar ventajas sobre los sistemas comercialmente disponibles, que emplean aireación, a fin de obtener una mayor cantidad de biomasa, con plantas de calidad y metabólicamente productivas.

Además, los autores emplearon una combinación de 6-BAP y GA, comparando frente a medios de cultivo MS basales, cuyos resultados concuerdan con lo obtenido en el presente estudio, en donde se empleó 6-BAP y ANA, observando que las fitohormonas demostraron una mayor eficiencia en cuanto a la tasa de multiplicación, una mayor cantidad de brotes y número de hojas, y longitud de hojas, donde, por supuesto, los resultados obtenidos en el SIT fueron mejores en gran medida, frente a los del medio semisólido. El empleo de estas fitohormonas se ha descrito previamente para multiplicación, puesto que las mismas están destinadas al desarrollo de las partes axilares y elongación de los brotes (Etienne & Berthouly, 2002). Así, el 6-BAP constituye la citoquinina más utilizada para la micropropagación y multiplicación de especies vegetales varias, gracias a su gran efectividad, puesto que este biorregulador tiende a acumularse tanto en sus formas conjugadas como en su forma no conjugada, estimulando la generación de brotes, en especies de importancia, como *Spathiphyllum wallisii* Regel, *Xanthosoma* spp., *Tectona grandis* Linn. F, *Psidium guajava* L., entre otros (Lourdes, Pérez & Torres, 2015; Pérez *et al.*, 2017).

De igual forma, en el estudio se empleó ANA, una auxina destinada a la micropropagación, que usualmente ha sido empleada con el 6-BAP para formar parte de formulaciones de medio de cultivo ideales para la generación de brotes, así como también para la generación de callos, ya que ha permitido generar brotes de color verde claro en especies como *Echinocereus cinerascens*, *Crambe orientalis* L. var. *orientalis* L., entre otras (Ceylan, Özdemir & Bülbül, 2017; Elias *et al.*, 2015).

En relación con la respuesta obtenida, se debe tomar en cuenta al genotipo del tabaco empleado. A pesar de que no se sabe la variedad utilizada en el presente reporte, un estudio llevado a cabo por Ali *et al.* (2007), en el que se emplearon las variedades K-399 y SPTG-172 para la formación de callos y posterior regeneración de plantas, demostró que a pesar de que la variedad SPTG-172 fue capaz de generar callos más rápido que la variedad K-399, esta última fue capaz de regenerar brotes, en un número significativamente mayor que la variedad SPTG-172. Esto hace necesario, determinar diferencias entre los cultivares disponibles en el país, a fin de establecer si existen diferencias significativas en la generación de plantas durante las etapas de multiplicación.

Adicionalmente, Escalona, *et al.* (1999) mencionan, que en relación al análisis del pH del medio de cultivo, los resultados que presentaron, pueden deberse a la asociación del pH con el punto de equilibrio cuando el material vegetal es adicionado al sistema, lo cual facilita significativamente la disponibilidad de los iones, ya que el SIT limita el movimiento de los iones cuando existe un cambio brusco de pH; frente al medio semisólido, donde el efecto del pH está relacionado con el agente gelificante (Escalona, *et al.*, 1999). Así, a pesar de que en el presente estudio no se evaluó el efecto del pH en la multiplicación del material vegetal, este parámetro puede ser evaluado a futuro. Cabe mencionar que, como se compararon medios basales frente a medios con fitohormonas, el efecto del pH, especialmente en el SIT pudo haber facilitado la disponibilidad de estas, frente a los sistemas semisólidos, lo cual será analizado a futuro. Finalmente, los autores señalan que obtuvieron una tasa de multiplicación mayor cuando el radio de medio de cultivo por explante, en el SIT, fue de 200 mL, mientras que, para valores superiores a dicho radio, los valores del peso fresco, seco y tasa de multiplicación se vieron comprometidos. En el presente estudio, se emplea un radio de 36 mL por explante, lo cual podría ser una variable para evaluar con miras de optimizar las condiciones de cultivo para *N. tabacum* en el sistema evaluado.

Paralelamente, Stanly, Bhatt & Keng (2010), evaluaron diferentes sistemas de cultivo, entre los que estaban sistemas semisólidos, líquidos y SIT para la micropropagación y generación de brotes de *Curcuma cedoaria* y *Zingiber*

zerumbet, empleando medios de cultivo basales suplementados con 6-BAP y AIB. En este estudio se empleó un sistema reusable Nalgene® modificado, donde se utilizaría el bombeo de aire filtrado con la finalidad de realizar el desplazamiento del medio de cultivo hacia el compartimento superior que actuaba como cámara de cultivo. Los resultados demostraron que, para ambas especies, los SITs fueron capaces de generar diferencias significativas frente a los medios semisólidos, sin embargo, no fueron capaces de generar diferencias significativas frente a los medios líquidos. En ambos sistemas, las plantas generadas poseían alturas similares, no obstante, cuando se trataba de hojas, las mismas eran mucho más grandes en el SIT y en el medio líquido que aquellas hojas provenientes de los medios semisólidos, concordando con lo obtenido en el presente estudio. Tanto el cultivo realizado en el SIT como en el medio líquido dieron lugar a una significativamente mayor cantidad de brotes frente a los obtenidos en medio semisólido, lo cual se ajusta con los resultados del presente estudio. Resulta, por otro lado, interesante resaltar que los autores compararon la concentración de sacarosa empleada, donde demostraron que los medios suplementados con 30 g/L de sacarosa (concentración empleada en el presente estudio) utilizados en los SITs, dieron lugar a un mayor número de brotes por explante para ambas especies, frente a 15 g/L de sacarosa. En relación a los medios líquidos, los cuales no presentaron diferencias significativas frente al peso fresco, seco y número de brotes, lo cual también ha sido reportado por Aragón al. (2010). Esto debe ser incluido en futuras investigaciones, en la medida en la que en el presente estudio no se incluyeron a los sistemas líquidos, tomando en cuenta los resultados reportados por los autores. En Stanly, Bhatt & Keng, (2010) establecieron que las plantas generadas poseían morfología similar en todos los sistemas, lo cual se ajusta a lo obtenido, demostrando que el SIT propuesto no genera complicaciones morfológicas durante el desarrollo de cada uno de los explantes. Los autores relatan que obtuvieron cerca de un 10% de hiperhidricidad tanto en el SIT como en el sistema líquido, lo cual no encaja con lo observado en el presente estudio, donde tanto en el SIT como en los medios semisólidos, ninguno de los explantes presentó hiperhidricidad. Esto nos permite establecer que el sistema desarrollado permitiría obtener material vegetal de

gran calidad, reduciendo la pérdida de biomasa cultivable, razón por la cual, resultaría necesario evaluar al material vegetal obtenido del cultivo *in vitro* en las etapas de enraizamiento y aclimatación, a fin de analizar la viabilidad en campo.

En otro estudio, Adelberg & Toler (2004) compararon un SIT *Rocker* frente al sistema semisólido para la micropropagación de *C. esculenta* (L.) Schott 'Fontanesii' y *A. macrorrhizos* G. Don. En concordancia con lo conseguido en el presente estudio, el SIT demostró generar plantas de mayor densidad, con un mayor número de hojas, las cuales poseían un mayor tamaño y peso seco relativo, frente a aquellas que fueron cultivadas en medio semisólido. Así, debemos recalcar que Etienne & Berthouly (2002) describen que dicho comportamiento se atribuye a la carencia de impurezas generadas del agar, mejor disponibilidad de agua y envases más grandes, resaltando esta última característica del diseño desarrollado, al ser fácilmente escalable. Conjuntamente, Adelberg & Toler (2004) en su estudio establecen que observaron que las tasas de multiplicación fueron superiores cuando la densidad de explantes era mínima, en relación a cuando la densidad del cultivo era alta, cuyo parámetro no se evaluó en el presente estudio, pero que representaría otro factor a analizar posteriormente. Asimismo, en la medida en que la densidad de explantes aumentaba, los autores señalaban que se incrementa la competencia por los solutos, espacio y luz dentro del recipiente, factores que resultarían ideales para ser evaluados en una optimización futura. En último lugar, los autores resaltan la idealidad de la renovación del medio de cultivo, a fin de eliminar la constante transferencia de medio de cultivo al sistema, lo cual resulta un punto clave a desarrollarse para el diseño final del SIT de este estudio.

En otro estudio, Yan, Yang & Li (2011) demostraron que la utilización de un SIT PLANTIMA permitía la obtención de material vegetal de calidad frente a las plantas obtenidas en medio semisólido y líquido. En el estudio se evaluaron los tres sistemas para la micropropagación de *Dioscorea fordii* y *Dioscorea alata*, empleando un medio de cultivo MS basal suplementado con 6-BAP y ANA en las mismas concentraciones utilizadas en el presente estudio. Los resultados demostraron que la longitud de los brotes, hojas y la tasa de multiplicación fue significativamente mayor en los SITs, en relación con los medios líquidos y

semisólidos, ajustándose a lo obtenido en el presente estudio. Por otra parte, los autores señalan que la adecuación de los SIT con ventilación, en este caso, renovación de la atmósfera, permitió obtener mejores resultados, contribuyendo a una mejor formación de brotes y raíces. Siendo una adecuación a incluirse en el sistema diseñado y, en consecuencia otro factor a tomar en cuenta durante la optimización, ya que tal y como establecen Etienne & Berthouly (2002), la inclusión de una correcta ventilación permite generar plantas con un aparato respiratorio y fotosintético mejorado, que influye durante las etapas *ex vitro*. Finalmente, los autores enraizaron varias plantas generadas en los SITs, para lo cual establecieron que, de haber una correcta oxigenación del medio de cultivo líquido en el sistema, se obtendrían mejores resultados para dicha etapa, haciendo que este punto sea necesario en el diseño final del SIT propuesto y tomando en cuenta que en el presente diseño se puede incluir fácilmente el control de dicho parámetro.

Por otra parte, en un estudio llevado a cabo por Aragón *et al.* (2010) se demostró en BITs, que a parte de los factores previamente descritos, la combinación de una alta intensidad de luz y una alta concentración de dióxido de carbono durante el cultivo con los SITs, dieron como lugar un alto porcentaje de plantas competentes que, comparadas con el tratamiento control, que poseía una baja intensidad de luz y una baja concentración de dióxido de carbono, presentaron una mejor recuperación del almidón en los tallos, acción que resulta de suma importancia para la supervivencia de las plantas durante las fases de elongación y endurecimiento. Esto representa una guía a tomar en cuenta para las siguientes fases de diseño y optimización del mismo. Así, junto con una adecuada concentración de sacarosa, las capacidades metabólicas de las plantas mejorarían, tanto para las etapas de endurecimiento y crecimiento, como para un subsecuente empleo de estas como sistemas para la producción de metabolitos secundarios de importancia, incluyendo al *Molecular Farming*, como también para especies que acumulen grandes cantidades de almidón y que resulten de importancia alimentaria, en donde nuestro sistema, presenta las características de diseño adecuadas para ser empleado.

En otra investigación, encajando con lo obtenido en el presente estudio, Bello-Bello *et al.* (2010) emplearon un sistema BioMINT™ para la multiplicación y elongación de brotes de *Capsicum chinense* Jacq., donde se obtuvieron cerca de 25 brotes por explante en 21 días de cultivo, comparado con los 15 brotes generados en medio semisólido, lo cual representó una diferencia significativa. Los brotes y las hojas elongaron más rápido en SIT que en los sistemas semisólidos, donde los mejores resultados se obtuvieron con una frecuencia de inmersión de 8h y un tiempo de inmersión de 2 min, difiriendo de los tiempos y frecuencias de inmersión empleados en el presente estudio, y en consecuencia se establece como factor a analizar en una optimización posterior. Para finalizar, los autores señalan que la inclusión de ventilación permitiría la eliminación parcial o total del etileno generado por el material vegetal, y que influye en el crecimiento de los explantes, lo que representó una clara desventaja, por lo que la inclusión de un sistema de renovación de atmósfera se posiciona como necesaria.

Un estudio realizado por Scherer *et al.* (2013), en el que se comparan dos SITs, el BIT y el RITA, destinados a la micropropagación de *Ananas comosus* var. *comosus*, demostraron generar tejidos con un color verde claro, sin hiperhidricidad y consistentes, frente a aquel material vegetal obtenido mediante medios semisólidos, el que se encontraba oxidado e hiperhidratado. Según los autores, esto está relacionado a los niveles de hipoxia, que generan diferentes respuestas celulares, incluyendo una fase de adaptación seguido de condiciones de alto estrés, tal y como establece Etienne & Berthouly, (2002). Los resultados obtenidos en el presente estudio, así como también en los otros estudios mencionados explicarían la razón, por la que los medios semisólidos representan una desventaja considerable frente a los SITs. Así, dentro del estudio, para la generación de peso fresco, el RITA fue el que obtuvo mejores resultados. Los autores establecen que es debido a que el RITA ofrece un ambiente menos húmedo, lo que causa un estrés osmótico, comparado con el BIT y los sistemas semisólidos, y en consecuencia podría explicar la obtención de resultados favorables en el presente estudio, tomando en cuenta que la inmersión de los explantes fue llevada a cabo durante un corto tiempo en comparación con el

resto de estudios y que, gracias al diseño del sistema propuesto, el ambiente es mucho menos húmedo, por lo que suponemos que esto representa una ventaja sobre los sistemas comercialmente disponibles.. Por consiguiente, en las fases de aclimatación, todas las plantas obtenidas a partir de los dos SITs no presentaron diferencias en la supervivencia, obteniendo un 92% de biomasa viable, parámetro que, como se había mencionado antes, podría ser comparado con plantas generadas en el SIT establecido.

Para culminar, Vidal, Blanco & Cuenca (2015), realizaron una comparación entre el RITA, PLANTFORM™ y BIT para la multiplicación axilar de *Castanea sativa* x *C. crenata* y *C. sativa* x *C. mollissima*. Los resultados demostraron que aquellos explantes cultivados en PLANTFORM™ por cinco semanas generaron brotes lo suficientemente largos para enraizamiento, mientras que los explantes apicales y nodales cultivados tanto en PLANTFORM™ como en RITA dieron lugar a brotes cortos que pueden ser empleados para mantenimiento. Adicionalmente, para la mayoría de los clones se observaron tasas de multiplicación y un número de brotes mayor en comparación con los medios semisólidos, correspondiendo con lo obtenido en el presente estudio. Asimismo, se reportó que varios explantes presentaron hiperhidricidad, la cual fue reducida mediante el empleo de frecuencias y tiempos de inmersión menores. Esto, representa por tanto una ventaja por parte del SIT desarrollado frente a los sistemas descritos, ya que los explantes generados no tuvieron hiperhidricidad y presentaron un desarrollo óptimo en un corto periodo, frente a los otros sistemas y especies.

Este es un estudio preliminar para este nuevo Sistema de Inmersión Temporal, que ha demostrado resultados prometedores, que concuerdan con, o, mejoran a lo obtenido con otros sistemas en otras especies vegetales. Resulta necesario desarrollar ensayos con otras especies vegetales de importancia, optimizando los parámetros discutidos previamente a fin de obtener resultados óptimos y de relevancia. Adicionalmente, el presente trabajo promueve la generación de tecnología nacional, siendo esta, en un futuro, una posible competencia con aquellos SITs establecidos en el mercado.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1. Conclusiones

Se desarrolló un prototipo funcional y semi-automatizado de un Sistema de Inmersión Temporal que permite la micropropagación masal de especies vegetales.

El correcto manejo del material vegetal como del equipo desarrollado dio lugar a que no exista contaminación en ninguno de los tratamientos llevados a cabo durante el experimento, lo cual resalta la capacidad de realización del mismo sin ninguna dificultad de tipo bacteriana o fúngica.

El presente estudio demostró que el empleo del nuevo prototipo de SIT aumentó de manera significativa el crecimiento y desarrollo de brotes de *N. tabacum* en comparación con los medios semisólidos, ya que el sistema ofrece una adecuada distribución de los nutrientes al material vegetal, junto con un intercambio gaseoso ideal del explante con el microambiente, aspecto relevante en el diseño del SIT.

A parte de los resultados obtenidos en relación al sistema, se observó que la adición de fitohormonas, como el 6-BAP y ANA, influyeron de manera significativa en la multiplicación, donde los mejores resultados en relación al número de brotes y hojas, tasa de multiplicación de los brotes y longitud de hojas, se evidenciaron en los tratamientos que contenían medios suplementados con dichas fitohormonas. Esto, por tanto, recalca la importancia del uso de biorreguladores en la obtención de grandes cantidades de biomasa viable.

El prototipo de SIT generado representa un punto de partida para futuras investigaciones, destinadas a la integración de otros parámetros de diseño y para la optimización de las condiciones de cultivo de diferentes especies vegetales de importancia, debido a que el diseño en el sistema propuesto resultó ser modificable y amigable con el usuario.

5.2. Recomendaciones

Se recomienda establecer un diseño experimental a fin de optimizar las condiciones de cultivo de *N. tabacum* en el SIT desarrollado.

Una vez validada la funcionalidad del SIT propuesto, se recomienda realizar pruebas con otras especies de importancia a nivel nacional.

Se recomienda modificar y adecuar el diseño del SIT desarrollado, a fin de incluir nuevas funcionalidades y prestaciones como la renovación de atmósfera y medio de cultivo, control de pH, entre otros.

Se recomienda la manipulación del SIT y del material vegetal en condiciones asépticas, a fin de evitar la contaminación bacteriana y fúngica.

REFERENCIAS

- Adelberg, J., & Toler, J. (2004). *Comparison of agar and an agitated, thin-film, liquid system for micropropagation of ornamental elephant ears*. *HortScience*, 39(5), 1088–1092. Recuperado el 24 de diciembre de 2018 de: <http://hortsci.ashspublications.org/content/39/5/1088.short>
- Aitken-Christie, J., & Davies, H. E. (1998). *Development of a semi-automated micropropagation system*. *Symposium on High Technology in Protected Cultivation 230*, 81–88. Recuperado el 24 de diciembre de 2018 de: https://www.actahort.org/books/230/230_7.htm
- Aitken-Christie, J., & Jones, C. (1987). *Towards automation: Radiata pine shoot hedges in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 8(3), 185–196. <https://doi.org/10.1007/BF00040945>
- Akita, M., & Ohta, Y. (1998). *A simple method for mass propagation of potato (Solanum tuberosum L.) using a bioreactor without forced aeration*. *Plant Cell Reports*, 18(3–4), 284–287. <https://doi.org/10.1007/s002990050572>
- Alaka, Dash, M., Molla, K. A., Behera, D., Baig, M. J., & Dash, B. P. (2018). *Oryza*. *ORYZA- An International Journal on Rice* (Vol. 55). Association of Rice Research Workers. Recuperado el 24 de diciembre de 2018 de: <http://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:oryza&volume=55&issue=1&article=002>
- Ali, Gowher; Hadi, Fazal; Ali, Zahir; Tariq, Muhammad; Ali Khan, M. (2007). *Callus Induction and in vitro Complete Plant Regeneration of Different Cultivars of Tobacco (Nicotiana tabacum L.) on Media of Different Hormonal Concentrations*. *Biotechnology(Faisalabad)*, 6(4), 561–566. <https://doi.org/10.3923/biotech.2007.561.566>
- Altman, A., & Loberant, B. (2003). *Micropropagation of Plants, Principles and Practices*. En *Encyclopedia of Cell Technology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471250570.spi076>
- Alvard, D., Cote, F., & Teisson, C. (1993). *Comparison of methods of liquid*

- medium culture for banana micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32(1), 55–60. <https://doi.org/10.1007/BF00040116>
- Alvarenga, I. C. A., Pacheco, F. V., Silva, S. T., Bertolucci, S. K. V., & Pinto, J. E. B. P. (2015). *In vitro culture of Achillea millefolium L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 122(2), 299–308. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0766-7>
- Antoniuzzi, C. A., Faria, R. B. de, Carvalho, P. P. de, Mikovski, A. I., Carvalho, I. F. de, Matos, E. M. de, ... Silva, M. L. da. (2018). *In vitro regeneration of triploid plants from mature endosperm culture of commercial passionfruit (Passiflora edulis Sims). Scientia Horticulturae*, 238, 408–415. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2018.05.001>
- Anzai, H., Yoneyama, K., & Yamaguchi, I. (1989). *Transgenic tobacco resistant to a bacterial disease by the detoxification of a pathogenic toxin. MGG Molecular & General Genetics*, 219(3), 492–494. <https://doi.org/10.1007/BF00259626>
- Aragón, C. E., Escalona, M., Rodríguez, R., Cañal, M. J., Capote, I., Pina, D., & González-Olmedo, J. (2010). *Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 46(1), 89–94. <https://doi.org/10.1007/s11627-009-9246-2>
- Arai, M., Saito, T., Kaneko, Y., & Matsushima, H. (1997). *Cellular origin and ultrastructural changes of regenerating shoots from tobacco (Nicotiana tabacum) internodes cultured in vitro. Physiologia Plantarum*, 99(4), 523–528. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb05352.x>
- Arakawa, T., Yu, J., Chong, D. K. X., Hough, J., Engen, P. C., & Langridge, W. H. R. (1998). *A plant-based cholera toxin B subunit–insulin fusion protein protects against the development of autoimmune diabetes. Nature Biotechnology*, 16(10), 934–938. <https://doi.org/10.1038/nbt1098-934>
- Arencibia, A. D., Vergara, C., Quiroz, K., Carrasco, B., Bravo, C., & Garcia-

- Gonzales, R. (2013). *An Approach for Micropropagation of Blueberry (Vaccinium corymbosum L.) Plants Mediated by Temporary Immersion Bioreactors (TIBs)*. *American Journal of Plant Sciences*, 04(05), 1022–1028. <https://doi.org/10.4236/ajps.2013.45126>
- Ashraf, M. F., Aziz, M. A., Stanslas, J., & Kadir, M. A. (2013). *Optimization of immersion frequency and medium substitution on microtuberization of Chlorophytum borivillianum in RITA system on production of saponins*. *Process Biochemistry*, 48(1), 73–77. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.12.001>
- Barg, R., & Umiel, N. (1977). *Development of tobacco seedlings and callus cultures in the presence of amitrole*. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie*, 83(5), 437–447. [https://doi.org/10.1016/S0044-328X\(77\)80050-0](https://doi.org/10.1016/S0044-328X(77)80050-0)
- Barretto, S. S., Michoux, F., Hellgardt, K., & 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, 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.10.007>
- Basra, A. S. (1994a). *Mechanisms of plant growth and improved productivity: modern approaches*. M. Dekker.
- Basra, A. S. (1994b). *Mechanisms of plant growth and improved productivity: modern approaches*. M. Dekker.
- Bates, G. W. (1990). *Asymmetric hybridization between Nicotiana tabacum and N. repanda by donor recipient protoplast fusion: transfer of TMV resistance*. *Theoretical and Applied Genetics*, 80(4), 481–487. <https://doi.org/10.1007/BF00226749>
- Beachy, R. N., Fitchen, J. H., & Hein, M. B. (1996). *Use of Plant Viruses for Delivery of Vaccine Epitopes*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 792(1 Engineering P), 43–49. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1996.tb32489.x>

- Bello-Bello, J., Canto-Flick, A., Balam-Uc, E., Gómez-Uc, E., Robert, M., G. Iglesias-Andreu, L., & Santana-Buzzy, N. (2010). *Improvement of In Vitro Proliferation and Elongation of Habanero Pepper Shoots (Capsicum chinense Jacq.) by Temporary Immersion*. *HortScience: a publication of the American Society for Horticultural Science* (Vol. 45).
- Berlyn, M. B. (1983). *Patterns of variability in DNA content and nuclear volume in regenerating cultures of Nicotiana tabacum*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 25(4), 354–360. <https://doi.org/10.1139/g83-055>
- Bhandari, N. S., & Aswath, C. (2018). *Standardization of an Effective Protocol for in vitro Culture of Lilium longiflorum Thunb cv. Pavia*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(04), 1183–1190. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.704.131>
- Brandizzi, F., Irons, S., Kearns, A., & Hawes, C. (2003). *BY-2 Cells: Culture and Transformation for Live Cell Imaging*. *Current Protocols in Cell Biology*, 19(1), 1.7.1-1.7.16. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0107s19>
- Britannica, E. (2011). *Encyclopedia - Britannica Online Encyclopedia*. <https://doi.org/10.1542/pir.32-3-91>
- Burrows, W. J., & Leworthy, D. P. (1976). *Metabolism of N,N'-diphenylurea by cytokinin-dependent tobacco callus: Identification of the glucoside*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 70(4), 1109–1114. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(76\)91017-2](https://doi.org/10.1016/0006-291X(76)91017-2)
- Carlson, P. S. (1970). *Induction and Isolation of Auxotrophic Mutants in Somatic Cell Cultures of Nicotiana tabacum*. *Science (New York, N.Y.)*, 168(3930), 487–489. <https://doi.org/10.1126/science.168.3930.487>
- Carlson, P. S., Smith, H. H., & Dearing, R. D. (1972). *Parasexual interspecific plant hybridization*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(8), 2292–2294. <https://doi.org/10.1073/PNAS.69.8.2292>
- Ceylan, Y., Özdemir, F. A., & Bülbül, A. S. (2017). *Effects of different*

concentrations of BAP and NAA on micropropagation of *Crambe orientalis* L. var. *orientalis* L. *JOURNAL OF ANIMAL AND PLANT SCIENCES*, 27(5), 1671–1677.

Chaleff, R. S., & Parsons, M. F. (1978). *Direct selection in vitro for herbicide-resistant mutants of Nicotiana tabacum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(10), 5104–5107. <https://doi.org/10.1073/PNAS.75.10.5104>

Chang, C., Bowman, J. L., Meyerowitz, E. M., Abe, J., Hori, S., Tsuchikane, Y. (2016). *Field Guide to Plant Model Systems*. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.031>

Chopra, V. L., & Malik, V. S. ed. . (2000). *Applied plant biotechnology*. Recuperado el 24 de diciembre de 2018 de: <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=UACHBC.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=094365>

Chupeau, Y., Missonier, C., Hommel, M.-C., & Goujaud, J. (1978). *Somatic hybrids of plants by fusion of protoplasts*. *MGG Molecular & General Genetics*, 165(3), 239–245. <https://doi.org/10.1007/BF00332522>

Conger, B. V. (2018). *Cloning Agricultural Plants Via In Vitro Techniques*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781351070706>

Cramer, C. L., Boothe, J. G., & Oishi, K. K. (2000). *Transgenic Plants for Therapeutic Proteins: Linking Upstream and Downstream Strategies*. En *Plant Biotechnology* (pp. 95–118). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-60234-4_5

Cuello, J. L., & Yue, L. C. (2008). *Ebb-and-Flow bioreactor regime and electrical elicitation: Eovel strategies for hairy root biochemical production*. *Electron. J. Integr. Biosci*, 3, 45–56. Recuperado el 24 de diciembre de 2018 de: <http://altweb.astate.edu/electronicjournal/Articles/Paper-CuelloFinal10.16.08.pdf>

Dai, Z., Meddar, M., Delrot, S., & Gomés, E. (2015). *Development and*

- Implementation of an in vitro Culture System for Intact Detached Grape Berries. BIO-PROTOCOL*, 5(12). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1510>
- Dale, P. J. (1995). *Regulation and field trialling of transgenic crops. Trends in Biotechnology*, 13(9), 398–403. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)88988-X](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)88988-X)
- Daniell, H., Guda, C., McPherson, D. T., Zhang, X., Xu, J., & Urry, D. W. (1997). *Hyperexpression of a Synthetic Protein-Based Polymer Gene*. In *Recombinant Protein Protocols* (pp. 359–372). New Jersey: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-481-X:359>
- Daniell, H., Streatfield, S. J., & Wycoff, K. (2001). *Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. Trends in Plant Science*, 6(5), 219–226. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)01922-7](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)01922-7)
- Daub, M. E. (1986). *Tissue Culture and the Selection of Resistance to Pathogens. Annual Review of Phytopathology*, 24(1), 159–186. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.24.090186.001111>
- Deaton, W. R., Collins, G. B., & Nielsen, M. T. (1986). *Vigor and variation expressed by anther-derived doubled haploids of burley tobacco (Nicotiana tabacum L.). I. Comparison of sexual and doubled-haploid populations. Euphytica*, 35(1), 33–40. <https://doi.org/10.1007/BF00028538>
- Debergh, P. C., & Read, P. E. (1991). *Micropropagation. Micropropagation*, 1–13. Recuperado el 24 de diciembre de 2018 de: https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-94-009-2075-0_1.pdf
- Eibl, R., & Eibl, D. (2008). *Design and use of the wave bioreactor for plant cell culture. Plan Tissue Culture Engineering*, 203–227. Recuperado el 24 de diciembre de 2018 de: https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-1-4020-3694-1_12.pdf
- Eibl, R., & Eibl, D. (2006). *Design And Use Of The Wave Bioreactor For Plant Cell Culture BT - Plan Tissue Culture Engineering*. In S. D. Gupta & Y.

- Ibaraki (Eds.) (pp. 203–227). Dordrecht: Springer Netherlands.
https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3694-1_12
- Eibl, R., Werner, S., & Eibl, D. (2009). *Disposable bioreactors for plant liquid cultures at Litre-scale. Engineering in Life Sciences*, 9(3), 156–164.
<https://doi.org/10.1002/elsc.200800102>
- Elias, H., Taha, R. M., Hasbullah, N. A., Mohamed, N., Manan, A. A., Mahmad, N., & Mohajer, S. (2015). *The effects of plant growth regulators on shoot formation, regeneration and coloured callus production in Echinocereus cinerascens in vitro. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 120(2), 729–739. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0642-x>
- Escalona, M., Lorenzo, J. C., González, B., Daquinta, M., González, J. L., Desjardins, Y., & Borroto, C. G. (1999). *Pineapple (Ananas comosus L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. Plant Cell Reports*, 18(9), 743–748. <https://doi.org/10.1007/s002990050653>
- Etienne, H., & Berthouly, M. (2002). *Temporary immersion systems in plant micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3), 215–231.
<https://doi.org/10.1023/A:1015668610465>
- Fitchen, J., Beachy, R. N., & Hein, M. B. (1995). *Plant virus expressing hybrid coat protein with added murine epitope elicits autoantibody response. Vaccine*, 13(12), 1051–1057. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(95\)00075-C](https://doi.org/10.1016/0264-410X(95)00075-C)
- Furuya, T., Kojima, H., & Syono, K. (1971). *Regulation of nicotine biosynthesis by auxins in tobacco callus tissues. Phytochemistry*, 10(7), 1529–1532.
[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(71\)85018-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(71)85018-5)
- Ganapathi, T. R., Suprasanna, P., Rao, P. S., & Bapat, V. A. (2004). *Tobacco (Nicotiana tabacum L.)-A model system for tissue culture interventions and genetic engineering. Indian Journal of Biotechnology*, 3, 171–184.
Recuperado el 24 de diciembre de 2018 de:
<http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/7722>

- Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A., & Bley, T. (2014). *Temporary immersion systems in plant biotechnology*. *Engineering in Life Sciences*, 14(6), 607–621. <https://doi.org/10.1002/elsc.201300166>
- Ghosh, S., Malhotra, P., Lalitha, P. ., Guha-Mukherjee, S., & Chauhan, V. . (2002). *Expression of Plasmodium falciparum C-terminal region of merozoite surface protein (PfMSP119), a potential malaria vaccine candidate, in tobacco*. *Plant Science*, 162(3), 335–343. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00555-6](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00555-6)
- Ghosh, S. P. (1999). *Biotechnology and its application in horticulture*. Narosa Pub. House. Recuperado el 24 de diciembre de 2018 de: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300056857>
- Giddings, G., Allison, G., Brooks, D., & Carter, A. (2000). *Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals*. *Nature Biotechnology*, 18(11), 1151–1155. <https://doi.org/10.1038/81132>
- Gleba, Y. Y., & Hoffmann, F. (1979). *Arabidobrassica: Plant-genome engineering by protoplast fusion*. *Naturwissenschaften*, 66(11), 547–554. <https://doi.org/10.1007/BF00368808>
- Golemboski, D. B., Lomonosoff, G. P., & Zaitlin, M. (1990). *Plants transformed with a tobacco mosaic virus nonstructural gene sequence are resistant to the virus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(16), 6311–6315. <https://doi.org/10.1073/PNAS.87.16.6311>
- Gómez F, M. (2006). ESTUDIO FITOCINÉTICO EN UN REACTOR DE INMERSIÓN TEMPORAL PARA LA PROPAGACIÓN IN VITRO DE ESPECIES VEGETALES. Universidad Central de Venezuela.
- Hannink, N., Rosser, S. J., French, C. E., Basran, A., Murray, J. A. H., Nicklin, S., & Bruce, N. C. (2001). *Phytodetoxification of TNT by transgenic plants expressing a bacterial nitroreductase*. *Nature Biotechnology*, 19(12), 1168–1172. <https://doi.org/10.1038/nbt1201-1168>
- Hansen, E. (1997). *Production of recombinant antigens in plants for animal and*

- human immunization - a review. Brazilian Journal of Genetics*, 20(4), 703–711. <https://doi.org/10.1590/S0100-84551997000400024>
- Haq, T. A., Mason, H. S., Clements, J. D., & Arntzen, C. J. (1995). *Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. Science (New York, N.Y.)*, 268(5211), 714–716. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.7732379>
- Harris, R. E., & Mason, E. B. B. (1983). *Two machines for in vitro propagation of plants in liquid media. Canadian Journal of Plant Science*, 63(1), 311–316. <https://doi.org/10.4141/cjps83-032>
- Haughn, G. W., & Somerville, C. (1986). *Sulfonylurea-resistant mutants of Arabidopsis thaliana. MGG Molecular & General Genetics*, 204(3), 430–434. <https://doi.org/10.1007/BF00331020>
- Heintz, R., & Benveniste, P. (1970). *Cyclisation de l'époxyde-2,3 de squalène par des microsomes extraits de tissus de tabac cultivés in vitro. Phytochemistry*, 9(7), 1499–1503. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)85267-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)85267-X)
- Hess, D. (1987). *Pollen-Based Techniques in Genetic Manipulation. International Review of Cytology*, 107, 367–395. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61082-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61082-7)
- Hicks, G. S., & Sussex, I. M. (1970). *Development in vitro of excised flower primordia of Nicotiana tabacum. Canadian Journal of Botany*, 48(1), 133–139. <https://doi.org/10.1139/b70-017>
- Kämäräinen-Karppinen, T., Virtanen, E., Rokka, V.-M., & Pirttilä, A. M. (2010). *Novel bioreactor technology for mass propagation of potato microtubers. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 101(2), 245–249. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9679-7>
- Kapusta, J., Modelska, A., Figlerowicz, M., Podkowinski, J., Pniewski, T., Lisowa, O., Legocki, A. B. (1999). *Biotechnological Approaches to Making Vaccine in Plants* (pp. 571–574). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-011-4661-6_129

- Klein, T. M., Harper, E. C., Svab, Z., Sanford, J. C., Fromm, M. E., & Maliga, P. (1988). *Stable genetic transformation of intact Nicotiana cells by the particle bombardment process. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(22), 8502–8505. <https://doi.org/10.1073/PNAS.85.22.8502>
- Koornneef, M., Reuling, G., & Karssen, C. M. (1984). *The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of Arabidopsis thaliana. Physiologia Plantarum*, 61(3), 377–383. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1984.tb06343.x>
- Krikorian, A. D., & Steward, F. C. (2012). *Biochemical differentiation: The biosynthetic potentialities of growing and quiescent tissue*. In F. C. Steward (Ed.), *Plant physiology—a treatise* (5th ed., pp. 227–326).
- Kumar, N., & Reddy, M. (2011). *In vitro Plant Propagation: A Review. Journal of Forest and Environmental Science* (Vol. 27).
- Kusnadi, A. R., Nikolov, Z. L., & Howard, J. A. (1997). *Production of recombinant proteins in transgenic plants: Practical considerations. Biotechnology and Bioengineering*, 56(5), 473–484. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19971205\)56:5<473::AID-BIT1>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19971205)56:5<473::AID-BIT1>3.0.CO;2-F)
- Lourdes R., Pérez, M., & Torres, D. (2015). Efecto de 6-BAP en la multiplicación in vitro de *Spathiphyllum wallisii* Regel. *Biotecnología Vegetal*, 15(1). Recuperado el 24 de diciembre de 2018 de: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/10>
- Lyam, P., Musa, M., O Jamaledine, Z., Anthony Okere, U., & Tiwalade Odofoin, W. (2012). *The Potential of Temporary Immersion Bioreactors (TIBs) in Meeting Crop Production Demand in Nigeria. Journal of Biology and Life Science* (Vol. 3). <https://doi.org/10.5296/jbls.v3i1.1156>
- M. Paula, W. (2012). *The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY*, 11(76). <https://doi.org/10.5897/AJB12.1693>

- Maene, L., & Debergh, P. (1985). *Liquid medium additions to established tissue cultures to improve elongation and rooting in vivo*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 5(1), 23–33. <https://doi.org/10.1007/BF00033566>
- Maheshwari, S. C., Rashid, A., & Tyagi, A. K. (1982). *Special paper: haploids from pollen grains-retrospect and prospect*. *American Journal of Botany*, 69(5), 865–879. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1982.tb13330.x>
- Maliga, P., Lázár, G., Joó, F., Nagy, A. H., & Menczel, L. (1977). *Restoration of morphogenic potential in Nicotiana by somatic hybridisation*. *MGG Molecular & General Genetics*, 157(3), 291–296. <https://doi.org/10.1007/BF00268665>
- Márton, L., Wullems, G. J., Molendijk, L., & SCHILPEROORT, R. A. (1979). *In vitro transformation of cultured cells from Nicotiana tabacum by Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, 277(5692), 129–131. <https://doi.org/10.1038/277129a0>
- Mason, H. S., & Arntzen, C. J. (1995). *Transgenic plants as vaccine production systems*. *Trends in Biotechnology*, 13(9), 388–392. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)88986-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)88986-6)
- Mason, H. S., Ball, J. M., Shi, J. J., Jiang, X., Estes, M. K., & Arntzen, C. J. (1996). *Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(11), 5335–5340. <https://doi.org/10.1073/PNAS.93.11.5335>
- McCormick, A. A., Kumagai, M. H., Hanley, K., Turpen, T. H., Hakim, I., Grill, L. K., Levy, R. (1999). *Rapid production of specific vaccines for lymphoma by expression of the tumor-derived single-chain Fv epitopes in tobacco plants*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(2), 703–708. <https://doi.org/10.1073/PNAS.96.2.703>
- Melchers, G., & Labib, G. (1974). *Somatic hybridisation of plants by fusion of protoplasts*. *MGG Molecular & General Genetics*, 135(4), 277–294. <https://doi.org/10.1007/BF00271144>

- Miki, B. L. A., Mcttugh, S. G., Labbe, H., Ouellet, T., Tolman, J. H., & Brandle, J. E. (1999). *Transgenic Tobacco: Gene Expression and Applications* (pp. 336–354). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-58439-8_25
- Miller, O. K., & Hughes, K. W. (1980). *Selection of paraquat-resistant variants of tobacco from cell cultures. In Vitro*, 16(12), 1085–1091. <https://doi.org/10.1007/BF02619259>
- Moury, B., Morel, C., Johansen, E., Guilbaud, L., Souche, S., Ayme, V., ... Jacquemond, M. (2004). *Mutations in Potato virus Y Genome-Linked Protein Determine Virulence Toward Recessive Resistances in Capsicum annuum and Lycopersicon hirsutum. Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(3), 322–329. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.3.322>
- Mroginski, L. A., & Kartha, K. K. (1981). *Regeneration of pea (Pisum sativum L. cv. Century) plants by in vitro culture of immature leaflets. Plant Cell Reports*, 1(2), 64–66. <https://doi.org/10.1007/BF00269274>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). *A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nabors, M. W., Daniels, A., Nadolny, L., & Brown, C. (1975). *Sodium chloride tolerant lines of tobacco cells. Plant Science Letters*, 4(3), 155–159. [https://doi.org/10.1016/0304-4211\(75\)90089-9](https://doi.org/10.1016/0304-4211(75)90089-9)
- Nabors, M. W., Gibbs, S. E., Bernstein, C. S., & Meis, M. E. (1980). *NaCl-Tolerant Tobacco Plants from Cultured Cells. Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie*, 97(1), 13–17. [https://doi.org/10.1016/S0044-328X\(80\)80061-4](https://doi.org/10.1016/S0044-328X(80)80061-4)
- Nagata, T., & Takebe, I. (1971). *Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. Planta*, 99(1), 12–20. <https://doi.org/10.1007/BF00392116>
- Navarro, G. E. Z., Honorato, A. E. S., Oyarzun, A. G. C., Rodriguez, E. A. T., Encalada, H. G. P., & Cantillana, P. A. Z. (2013). *Thermo-photo-bioreactor and method for the culture and mass micropropagation of Deschampsia*

antarctica in vitro. U.S. Patent Application No. 13/884,365. Recuperado el 24 de diciembre de 2018 de: <https://patents.google.com/patent/US20130344528A1/en>

Newhouse, K., Singh, B., Shaner, D., & Stidham, M. (1991). *Mutations in corn (Zea mays L.) conferring resistance to imidazolinone herbicides*. *Theoretical and Applied Genetics*, 83(1), 65–70. <https://doi.org/10.1007/BF00229227>

Niemenak, N., Saare-Surminski, K., Rohsius, C., Ndoumou, D. O., & Lieberei, R. (2008). *Regeneration of somatic embryos in Theobroma cacao L. in temporary immersion bioreactor and analyses of free amino acids in different tissues*. *Plant Cell Reports*, 27(4), 667–676. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0497-2>

Nitsch, J. P., & Ohyama, K. (1971). *Obtention de plantes a partir de protoplastes haploides cultives in vitro*. *Acad Sci Paris C R Ser D*. Recuperado el 24 de diciembre de 2018 de: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302257279>

Ogura, H. (1976). *The cytological chimeras in original regenerates from tobacco tissue cultures and in their offsprings*. *The Japanese Journal of Genetics*, 51(3), 161–174. <https://doi.org/10.1266/jjg.51.161>

Ohta, S., & Yatazawa, M. (1989). *Nicotiana tabacum L. (Tobacco): In Vitro Production of Nicotine* (pp. 367–380). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-73617-9_20

Okamuro, J. K., & Goldberg, R. B. (1985). *Tobacco single-copy DNA is highly homologous to sequences present in the genomes of its diploid progenitors*. *MGG Molecular & General Genetics*, 198(2), 290–298. <https://doi.org/10.1007/BF00383009>

Peña-Ramírez, Y. J., Juárez-Gómez, J., Gómez-López, L., Jerónimo-Pérez, J. L., García-Sheseña, I., González-Rodríguez, J. A., & Robert, M. L. (2010). *Multiple adventitious shoot formation in Spanish Red Cedar (Cedrela odorata L.) cultured in vitro using juvenile and mature tissues: an improved micropropagation protocol for a highly valuable tropical tree species*. *In Vitro*

Cellular & Developmental Biology - Plant, 46(2), 149–160.
<https://doi.org/10.1007/s11627-010-9280-0>

- Pérez, M. B., Vega, V. R. M., Pino, A. S., Núñez, Y. T., Jiménez, A. R., Torres, J. L., Sánchez, Y. G. (2017). Influencia del medio de cultivo en la multiplicación in vitro de *Xanthosoma*, cvs. 'INIVIT MX-2007' y 'México-8.' *Agricultura Tropical*, 3(1). Recuperado el 24 de diciembre de 2018 de: <http://ojs.inivit.cu/index.php?journal=inivit&page=article&op=view&path%5B%5D=64>
- Phillips, D. R., Rasbery, J. M., Bartel, B., & Matsuda, S. P. (2006). *Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization*. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(3), 305–314. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2006.03.004>
- Prabhudesai, V. R., & Narayanaswamy, S. (1974). *Organogenesis in tissue cultures of certain asclepiads*. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie*, 71(2), 181–185. [https://doi.org/10.1016/S0044-328X\(74\)80023-1](https://doi.org/10.1016/S0044-328X(74)80023-1)
- Primiani, M. M., Cotterman, J. C., & Saari, L. L. (1990). *Resistance of Kochia (Kochia scoparia) to Sulfonylurea and Imidazolinone Herbicides*. *Weed Technology*, 4(01), 169–172. <https://doi.org/10.1017/S0890037X00025185>
- Quiala, E., Cañal, M.-J., Meijón, M., Rodríguez, R., Chávez, M., Valledor, L., ... Barbón, R. (2012). *Morphological and physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BA treatments*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 109(2), 223–234. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-0088-3>
- Radin, D. N., & Carlson, P. S. (1978). *Herbicide-tolerant tobacco mutants selected in situ and recovered via regeneration from cell culture*. *Genetical Research*, 32(01), 85. <https://doi.org/10.1017/S0016672300018553>
- Rasmussen, J., Kikkert, J., Roy, M., & Sanford, J. (1994). *Biolistic transformation of tobacco and maize suspension cells using bacterial cells as microprojectiles*. *Plant Cell Reports*, 13–13(3–4), 212–217. <https://doi.org/10.1007/BF00239895>

- Reed, S., & Collins, G. B. (1978). *Interspecific hybrids in Nicotiana through in vitro culture of fertilized ovules*. *Journal of Heredity*, 69(5), 311–315. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a108956>
- Reinert, J., Bajaj, Y. P. S., Nitsch, C., Clapham, D. H., & Jensen, C. J. (1977). *Haploids*. In *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* (pp. 249–340). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-02279-5_2
- Reis, R. V., Borges, A. P. P. L., Chierrito, T. P. C., de Souto, E. R., de Souza, L. M., Iacomini, M., ... Gonçalves, R. A. C. (2011). *Establishment of adventitious root culture of Stevia rebaudiana Bertoni in a roller bottle system*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 106(2), 329–335. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-9925-7>
- Robert, M. L., Herrera-Herrera, J. L., Herrera-Herrera, G., Herrera-Alamillo, M. Á., & Fuentes-Carrillo, P. (2006). *A New Temporary Immersion Bioreactor System for Micropropagation BT - Plant Cell Culture Protocols*. In V. M. Loyola-Vargas & F. Vázquez-Flota (Eds.) (pp. 121–129). Totowa, NJ: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-959-1:121>
- Rodrigues, P. H. V., Teixeira, F. M., Lima, A. M. L. P., & Ambrosano, G. M. B. (2006). *Propagação de mudas de helicônia em biorreator de imersão temporária*. *Bragantia*. Recuperado el 24 de diciembre de 2018 de: <http://repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/82502>
- Rosales Maldonado, E., Rodríguez De Francisco, L. E., & Gómez Alvarado, O. (2003). *Diseño y construcción de un sistema de inmersión temporal*. *Centro Agrícola*. <https://doi.org/10.1007/s10943-011-9532-2>
- Ruggiero, F., Exposito, J.-Y., Bournat, P., Gruber, V., Perret, S., Comte, J., ... Theisen, M. (2000). *Triple helix assembly and processing of human collagen produced in transgenic tobacco plants*. *FEBS Letters*, 469(1), 132–136. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01259-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01259-X)
- Salt, D. E., Blaylock, M., Kumar, N. P. B. A., Dushenkov, V., Ensley, B. D., Chet, I., & Raskin, I. (1995). *Phytoremediation: A novel strategy for the removal of*

toxic metals from the environment using plants. Bio/Technology.
<https://doi.org/10.1038/nbt0595-468>

Sankar-Thomas, Y. D., & Lieberei, R. (2011). *Camptothecin accumulation in various organ cultures of Camptotheca acuminata Decne grown in different culture systems. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 106(3), 445–454.* <https://doi.org/10.1007/s11240-011-9942-6>

Sankar-Thomas, Y. D., Saare-Surminski, K., & Lieberei, R. (2008). *Plant regeneration via somatic embryogenesis of Camptotheca acuminata in temporary immersion system (TIS). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 95(2), 163–173.* <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9428-3>

Sardana, R., Dukijandjiev, S., Giband, M., Cheng, X., Cowan, K., Sauder, C., & Altosaar, I. (1996). *Construction and rapid testing of synthetic and modified toxin gene sequences CryIA by expression in maize endosperm culture. Plant Cell Reports, 15(9), 677–681.* <https://doi.org/10.1007/BF00231923>

Scheidt, G. N., Silva, A. L. L., Oliveira, Y., Costa, J. L., Biasi, L. A., & Soccol, C. R. (2011). *In vitro growth of Melaleuca alternifolia Cheel in bioreactor of immersion by bubbles. Pak. J. Bot, 43(6), 2937–2939.* Recuperado el 24 de diciembre de 2018 de: [http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/43\(6\)/48.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/43(6)/48.pdf)

Scherer, R. F., Garcia, A. C., de Freitas Fraga, H. P., Dal Vesco, L. L., Steinmacher, D. A., & 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 24 de diciembre de 2018 de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423812005560>

Schumann, A., Berkov, S., Claus, D., Gerth, A., Bastida, J., & Codina, C. (2012). *Production of Galanthamine by Leucojum aestivum Shoots Grown in Different Bioreactor Systems. Applied Biochemistry and Biotechnology, 167(7), 1907–1920.* <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9743-3>

Sequeira, Á., Tapia, E., Ortega, M., Zamora, P., Castro, Á., Montes, C., Prieto, H. (2012). *Production of phenolic metabolites by Deschampsia antarctica*

shoots using UV-B treatments during cultivation in a photobioreactor. Electronic Journal of Biotechnology, 15(4). <https://doi.org/10.2225/vol15-issue4-fulltext-7>

Sharp, W R; Evans, D A; Ammirato, P V; Yamada, Y. (1984). *Handbook of plant cell culture. Volume 2. Crop species (Book) | ETDEWEB.* (Y. Sharp, W R; Evans, D A; Ammirato, P V; Yamada, Ed.). London: Collier Macmillan Publishers. Recuperado el 24 de diciembre de 2018 de: <https://www.osti.gov/etdeweb/biblio/5500851>

Sidorov, V. A., Menczel, L., Nagy, F., & Maliga, P. (1981). *Chloroplast transfer in Nicotiana based on metabolic complementation between irradiated and iodoacetate treated protoplasts. Planta, 152(4), 341–345.* <https://doi.org/10.1007/BF00388259>

Sidorov, V., Menczel, L., & Maliga, P. (1981). *Isoleucine-requiring Nicotiana plant deficient in threonine deaminase. Nature, 294(5836), 87–88.* <https://doi.org/10.1038/294087a0>

Sigee, D. C., Smith, V. A., & Hindley, J. (1982). *Passage of bacterial DNA into host cells during in vitro transformation of Nicotiana tabacum by Agrobacterium tumefaciens. Microbios, 34(136), 113–132.* Recuperado el 24 de diciembre de 2018 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7144594>

Simonton, W., Robacker, C., & Krueger, S. (1991). *A programmable micropropagation apparatus using cycled liquid medium. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 27(2), 211–218.* <https://doi.org/10.1007/BF00041292>

Skoog, F. (1944). *Growth and organ formation in tobacco tissue cultures. American Journal of Botany, 31(1), 19–24.* <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1944.tb07997.x>

Skoog, F., & Miller, C. O. (1957). *Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. Symposia of the Society for Experimental Biology, 11, 118–130.* Recuperado el 24 de diciembre de 2018 de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13486467>

- Skoog, F., & Tsui, C. (1948). *Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segments and callus cultured in vitro*. *American Journal of Botany*, 35(10), 782–787. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1948.tb08148.x>
- Smith, H. H., Kao, K. N., & Combatti, N. C. (1976). *Interspecific Hybridization by Protoplast Fusion in Nicotiana: Confirmation and extension*. *Journal of Heredity*, 67(3), 123–128. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a108685>
- Soh, W.-Y., & Bhojwani, S. S. (1999). *Morphogenesis in plant tissue cultures*.
- Spanswick, R. M., Lucas, W. J. (William J. ., & Dainty, J. (1980). *Plant membrane transport: current conceptual issues: proceedings of the international workshop held in Toronto, Canada, July 22-27, 1979*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. Recuperado el 24 de diciembre de 2018 de: <http://eprints.maynoothuniversity.ie/9783/>
- Staczek, J., Bendahmane, M., Gilleland, L. B., Beachy, R. N., & Gilleland, H. E. (2000). *Immunization with a chimeric tobacco mosaic virus containing an epitope of outer membrane protein F of Pseudomonas aeruginosa provides protection against challenge with P. aeruginosa*. *Vaccine*, 18(21), 2266–2274. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(99\)00571-X](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(99)00571-X)
- Stanly, C., Bhatt, A., & Keng, C. L. (2010). *A comparative study of Curcuma zedoaria and Zingiber zerumbet plantlet production using different micropropagation systems*. *African Journal of Biotechnology*, 9(28), 4326–4333. Recuperado el 24 de diciembre de 2018 de: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/82652>
- Staub, J. M., Garcia, B., Graves, J., Hajdukiewicz, P. T. J., Hunter, P., Nehra, N., Russell, D. A. (2000). *High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts*. *Nature Biotechnology*, 18(3), 333–338. <https://doi.org/10.1038/73796>
- Steingroewer, J., Bley, T., Georgiev, V., Ivanov, I., Lenk, F., Marchev, A., & Pavlov, A. (2013). *Bioprocessing of differentiated plant in vitro systems*.

- Engineering in Life Sciences*, 13(1), 26–38.
<https://doi.org/10.1002/elsc.201100226>
- Steinmacher, D. A., Guerra, M. P., Saare-Surminski, K., & Lieberei, R. (2011). A temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. *Annals of Botany*, 108(8), 1463–1475.
- Steward, F. C., Caplin, S. M., & Millar, F. K. (1952). *Investigations on Growth and Metabolism of Plant Cells: New Techniques for the Investigation of Metabolism, Nutrition and Growth in Undifferentiated Cells*. *Annals of Botany*, 16(1), 57–79. Recuperado el 24 de diciembre de 2018 de: <https://academic.oup.com/aob/article-abstract/16/1/57/166794>
- Sunderland, N., & Roberts, M. (1977). *New approach to pollen culture*. *Nature*, 270(5634), 236–238. <https://doi.org/10.1038/270236a0>
- Sunderland, N., & Wicks, F. M. (1971). *Embryoid Formation in Pollen Grains of Nicotiana tabacum*. *Journal of Experimental Botany*, 22(1), 213–226. <https://doi.org/10.1093/jxb/22.1.213>
- Suprasanna, P., & Rao, P. S. (1997). *Selection of mutants using plant cell and tissue culture techniques*. *Advances in Plant Physiology*, 1, 103–122.
- Suzuki, M., & Takebe, I. (1976). *Uptake of Single-Stranded Bacteriophage DNA by Isolated Tobacco Protoplasts*. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie*, 78(5), 421–433. [https://doi.org/10.1016/S0044-328X\(76\)80089-X](https://doi.org/10.1016/S0044-328X(76)80089-X)
- Tabata, M., & Hiraoka, N. (1976). *Variation of Alkaloid Production in Nicotiana rustica Callus Cultures*. *Physiologia Plantarum*, 38(1), 19–23. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1976.tb04851.x>
- Tackaberry, E. ., Dudani, A. ., Prior, F., Tocchi, M., Sardana, R., Altosaar, I., & Ganz, P., (1999). *Development of biopharmaceuticals in plant expression systems: cloning, expression and immunological reactivity of human cytomegalovirus glycoprotein B (UL55) in seeds of transgenic tobacco*. *Vaccine*, 17(23–24), 3020–3029. <https://doi.org/10.1016/S0264->

410X(99)00150-4

- Teisson, C., & Alvard, D. (1995). *A New Concept of Plant In Vitro Cultivation Liquid Medium: Temporary Immersion* (pp. 105–110). https://doi.org/10.1007/978-94-011-0307-7_12
- Teisson, C., & Alvard, D. (1999). *In vitro production of potato microtubers in liquid medium using temporary immersion*. *Potato Research*, 42(3–4), 499–504. <https://doi.org/10.1007/BF02358166>
- Thorpe, T. A., & Murashige, T. (1970). *Some histochemical changes underlying shoot initiation in tobacco callus cultures*. *Canadian Journal of Botany*, 48(2), 277–285. <https://doi.org/10.1139/b70-042>
- Tisserat, B., & Vandercook, C. E. (1985). *Development of an automated plant culture system*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 5(2), 107–117. <https://doi.org/10.1007/BF00040307>
- Toncelli, F., Martini, G., Giovinazzo, G., & Ronchi, V. N. (1975). *Role of permanent dicentric systems in carrot somatic embryogenesis*. *Theoretical and Applied Genetics*, 70(4), 345–348. <https://doi.org/10.1007/bf00273737>
- Toyoda, H., Chatani, K., Matsuda, Y., & Ouchi, S. (1989). *Multiplication of tobacco mosaic virus in tobacco callus tissues and in vitro selection for viral disease resistance*. *Plant Cell Reports*, 8(8), 433–436. <https://doi.org/10.1007/BF00269042>
- Tran Thanh Van, K., Richard, L., & Gendy, C. A. (1990). *An Experimental Model for the Analysis of Plant/Cell Differentiation: Thin Cell Layer Concept, Strategy, Methods, Records and Potential*. In *Plant Aging* (pp. 215–224). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5760-5_26
- Tuboly, T., Yu, W., Bailey, A., Degrandis, S., Du, S., Erickson, L., & Nagy, É. (2000). *Immunogenicity of porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein expressed in plants*. *Vaccine*, 18(19), 2023–2028. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(99\)00525-3](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(99)00525-3)
- Turpen, T. H., Reinl, S. J., Charoenvit, Y., Hoffman, S. L., Fallarme, V., & Grill, L.

- K. (1995). *Malaria Epitopes Expressed on the surface of Recombinant Tobacco Mosaic Virus*. *Nature Biotechnology*, 13(1), 53–57. <https://doi.org/10.1038/nbt0195-53>
- Uchendu, E. E., Paliyath, G., Brown, D. C. W., & Saxena, P. K. (2011). *In vitro propagation of North American ginseng (Panax quinquefolius L.)*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 47(6), 710–718. <https://doi.org/10.1007/s11627-011-9379-y>
- Uchimiya, H., & Murashige, T. (1974). *Evaluation of parameters in the isolation of viable protoplasts from cultured tobacco cells*. *Plant Physiology*, 54(6), 936–944. <https://doi.org/10.1104/PP.54.6.936>
- USDA. (2014). *Plants Database*. <https://doi.org/10.1039/C6CP01333C>
- Guttenberg, H. (1943). *Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen*. *Planta*, 33(4), 576–588. <https://doi.org/10.1007/BF01916543>
- Van Slogteren, G. M. S., Planqué, K., & Lekkerkerk, J. (1980). *Evaluation of parameters affecting the initiation of division of protoplasts of haploid and diploid Nicotiana sylvestris and Nicotiana tabacum*. *Plant Science Letters*, 20(1), 35–45. [https://doi.org/10.1016/0304-4211\(80\)90067-X](https://doi.org/10.1016/0304-4211(80)90067-X)
- Vasil, V., & Vasil, I. K. (1974). *Regeneration of tobacco and petunia plants from protoplasts an culture of corn protoplasts*. *In Vitro*, 10(1–2), 83–96. <https://doi.org/10.1007/BF02615342>
- Venkateswarlu, T., Subashini, K., & Reddi, V. R. (1987). *Variability in Callus Derived Plants of an Interspecific Hybrid in Nicotiana*. *Plant Cell and Tissue Culture of Economically Important Plants: Proceedings of National Symposium*, 271.
- Verbruggen, N., & Hermans, C. (2008). *Proline accumulation in plants: a review*. *Amino Acids*, 35(4), 753–759. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0061-6>
- Verch, T., Yusibov, V., & Koprowski, H. (1998). *Expression and assembly of a full-length monoclonal antibody in plants using a plant virus vector*. *Journal of Immunological Methods*, 220(1–2), 69–75. <https://doi.org/10.1016/S0022->

1759(98)00149-5

- Vidal, N. Blanco, B. Cuenca, B. (2015). *A temporary immersion system for micropropagation of axillary shoots of hybrid chestnut. Plant Cell Tiss Organ Cult*, 123, 229–243.
- Vose, P. B., & Blixt, S. G. (1983). *Crop breeding : a contemporary basis*. Elsevier Science.
- Weete, J. D., Venketeswaran, S., & Laseter, J. L. (1971). *Two populations of aliphatic hydrocarbons of teratoma and habituated tissue cultures of tobacco. Phytochemistry*, 10(5), 939–943. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89921-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89921-5)
- Woodard, S. L., Howard, J. A., & Horn, M. E. (2004). *Plant molecular farming: systems and products. Plant Cell Reports*, 22(10), 711–720. <https://doi.org/10.1007/s00299-004-0767-1>
- Yan, H., Yang, L., & Li, Y. (2011). *Improved growth and quality of Dioscorea fordii Prain et Burk and Dioscorea alata plantlets using a temporary immersion system. African Journal of Biotechnology*, 10(83), 19444–19448. Recuperado el 24 de diciembre de 2018 de: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/99066>
- Yan, H., Liang, C., & Li, Y. (2010). *Improved growth and quality of Siraitia grosvenorii plantlets using a temporary immersion system. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 103(1), 131–135. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9752-2>
- Yan, H., Litao, Y., & Li, Y. (2013). *Improved growth and quality of Dioscorea fordii Prain et Burk and Dioscorea alata plantlets using a temporary immersion system. Afr. J. Biotechnol.* (Vol. 10).
- Yang, L., Zambrano, Y., Hu, C.-J., Carmona, E. R., Bernal, A., Pérez, A., Arencibia, A. D. (2010). *Sugarcane metabolites produced in CO₂-rich temporary immersion bioreactors (TIBs) induce tomato (Solanum lycopersicum) resistance against bacterial wilt (Ralstonia solanacearum). In*

Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 46(6), 558–568.
<https://doi.org/10.1007/s11627-010-9312-9>

Yu, R., Baniaga, A. E., Jorgensen, S. A., & Barker, M. S. (2017). *A Successful in vitro Propagation Technique for Resurrection Plants of the Selaginellaceae*. *American Fern Journal*, 107(2), 96–104. <https://doi.org/10.1640/0002-8444-107.2.96>

Zeppernick, B., Schäfer, F., Paasch, K., Arnholdt-Schmitt, B., & Neumann, K.-H. (1994). *Studies on the relationship between ploidy level, morphology, the concentration of some phytohormones and the nicotine concentration of haploid and doubled haploid tobacco (Nicotiana tabacum L.) and NICA plants*. In *Primary and Secondary Metabolism of Plants and Cell Cultures III* (pp. 135–141). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0237-7_6

Zhang, L., Rylott, E. L., Bruce, N. C., & Strand, S. E. (2017). *Phytodetoxification of TNT by transplastomic tobacco (Nicotiana tabacum) expressing a bacterial nitroreductase*. *Plant Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1007/s11103-017-0639-z>

