

## Influencia de los parámetros del biorreactor de inmersión temporal sobre el desarrollo de plántulas de *Guarianthe skinneri* (Orchidaceae)

Jorge Ochoa Bonilla, Sonia Ruiz González, Gemelli López Martínez, Isidro Ovando Medina\*

Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas, México.

### Resumen

En este trabajo se evaluó el efecto de 3 frecuencias (8, 12 y 24 h) y 3 tiempos de inmersión (7, 14 y 21 min) en un biorreactor de inmersión temporal (BIT®) y un sistema convencional (medio semisólido) sobre la morfología de plántulas de *Guarianthe skinneri*, utilizando 10 plántulas por tratamiento con una altura de 4 a 6 cm, 2 hojas y sin raíces. Se obtuvo mayor altura con la frecuencia y tiempo de inmersión de 24 h y 21 min respectivamente, mayor formación de brotes con la frecuencia y tiempo de inmersión de 12 h y 21 min respectivamente y mayor formación de cutícula con la frecuencia y tiempo de inmersión de 8 h y 14 min respectivamente. El biorreactor de inmersión temporal fue el mejor sistema de micropropagación para el desarrollo de plántulas de *G. skinneri* con mayor altura, tasa de multiplicación y formación de cutícula que un sistema semisólido.

## Influence of the parameters of the temporary immersion bioreactor on the development of *Guarianthe skinneri* plantlets

### Abstract

In this work we evaluated the effect of three frequencies (8, 12 and 24 h) and three times of immersion (7, 14 and 21 min) in a temporary immersion bioreactor (BIT®) on the plantlet morphology of *Guarianthe skinneri* and was compared to conventional system (semi-solid medium). Ten plantlets of 4 to 6 cm height, with two leaves and without roots by treatment were used. Higher plantlet height was obtained with the frequency and time of immersion of 24 h and 21 min, respectively. More shoots were formed with the frequency and immersion time of 12 h and 21 min, respectively, and greater cuticle thickness was obtained with the frequency and immersion time of 8 h and 14 min, respectively. The BIT® was the best micropropagation system for the development of *G. skinneri* plantlets with higher height, multiplication rate and cuticle formation compared with a semi-solid system.

### Palabras clave:

Frecuencia de inmersión  
Micropropagación  
Tiempo de inmersión  
Tasa de multiplicación

### Keywords:

Immersion frequency  
Immersion time  
Micropropagation  
Multiplication rate

### \* Autor para correspondencia:

Instituto de Biociencias,  
Universidad Autónoma de  
Chiapas.  
Boulevard Príncipe Akishino  
sin número. Colonia  
Solidaridad 2000, CP.  
30798.  
Tapachula, Chiapas, México.  
Teléfono: + 52 9626427972.  
Correo-electrónico:  
isidro.ovando@unach.mx

## 1. Introducción

*Guarianthe skinneri* es una planta epífita perteneciente a la familia Orchidaceae, es nativa de la región mesoamericana con distribución natural desde México a Panamá (Coello et al., 2010; Coutiño-Cortes et al., 2018). El uso ornamental de esta orquídea ha producido un aumento en su demanda (Coello et al., 2010), siendo objeto de extracción y comercio ilícito; por esta razón es catalogada como “amenazada”, bajo la sinonimia *Cattleya skinneri*, dentro de la norma oficial mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 (Coello et al., 2010; Coutiño-Cortes et al., 2018). Una de las causas de que *G. skinneri* se encuentre en dicha categoría de amenaza es su baja tasa de reproducción natural, ya sea por medios vegetativos o por germinación de las semillas.

De forma natural, las semillas de las orquídeas requieren de un hongo micorrízico para germinar, debido a que carecen de reservas y cotiledones funcionales, con lo cual, tan solo de 2 a 5% de germinación para los miles de semillas que se producen en cada fruto (Pineda, 2018).

Para aumentar el porcentaje de germinación de las semillas se ha utilizado la micropropagación debido a que utiliza medios de cultivo que proveen los nutrientes necesarios de manera asimbiótica, logrando aumentar el porcentaje de germinación hasta 80% (Menchaca-García et al., 2012). Sin embargo, cuando las plántulas son llevadas a condiciones *ex vitro* en la etapa de aclimatación, disminuyen su desarrollo y rendimiento fotosintético debido a los cambios repentinos en las condiciones ambientales, causando altos porcentajes de plántulas perdidas o dañadas (Francisco-Nava et al., 2011). Lo anterior se debe a que durante el cultivo *in vitro* las plántulas permanecen en recipientes cerrados, con humedad relativa cercana al 100%, ocasionando que las hojas no se desarrollen correctamente y que los estomas no sean funcionales (Orellano et al., 2017). Bajo estas condiciones es fácil que una planta se deshidrate y muera al salir del recipiente. Para evitar lo anterior, se han desarrollado procesos de cultivo donde la plántula no está en contacto permanente con el medio de cultivo. Existen diferentes métodos disponibles, entre los que destacan el cultivo biorreactor de inmersión temporal (BIT®).

El sistema de inmersión temporal (SIT) es aquel en el que se realizan inmersiones periódicas de los explantes en el medio de cultivo, lo que permite el intercambio gaseoso dentro del recipiente (Zúñiga et al., 2009). Los SIT pueden ser semi-automatizados o automatizados, basados en frecuencias y tiempos de inmersión de las plantas en medio de cultivo líquido, seguido del drenado del mismo, logrando que las plantas se encuentren en un ambiente renovado de gases y eviten el estrés por oxidación y vitrificación (Orellano et al., 2017).

El BIT® o recipientes gemelos de inmersión temporal, es un sistema que consiste en dos recipientes conectados entre sí mediante tubos de silicona. Uno se utiliza como contenedor del material vegetal y el otro como contenedor de medio de cultivo. Para la ventilación se conecta un filtro hidrofóbico de aire de 0.22 µm esterilizable en cada recipiente. Las

inmersiones temporales se regulan mediante un programa computarizado conectado a válvulas solenoides. Al abrir una de las válvulas el medio de cultivo fluye desde el recipiente que lo contiene al recipiente que contiene el material vegetal, al abrirla nuevamente, el medio de cultivo fluye de regreso a su recipiente. Mediante este sistema, el material vegetal es inmerso en medio de cultivo por un tiempo definido, permitiendo la absorción de nutrientes en toda la superficie del material vegetal. La renovación del ambiente gaseoso en el recipiente del material vegetal se lleva a cabo cuando el medio de cultivo fluye de regreso al recipiente que lo contiene (Vilchez y Albany, 2014).

En función de lo anterior, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar la influencia de los parámetros del biorreactor de inmersión temporal sobre el desarrollo de plántulas de *G. skinneri*.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Material vegetal

Se utilizaron plántulas de *G. skinneri* cultivadas *in vitro* mediante organogénesis, proporcionadas por el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Biociencias de la Universidad Autónoma de Chiapas, ubicado en el municipio de Tapachula, Chiapas, México. Las *in vitro* plantas fueron subcultivadas en frascos de vidrio de 250 mL con 25 mL de medio MS (Murashige y Skoog, 1962) sin suplementos hormonales. Para llevar a cabo los experimentos en biorreactor de inmersión temporal (BIT®) se utilizaron plántulas de 4 a 6 cm de altura, con dos hojas y sin raíces.

### 2.2. Biorreactor de inmersión temporal

Los BIT® se conformaron por dos frascos de vidrio de 400 mL, el primero contenía 250 mL de medio de cultivo MS y el segundo frasco 10 vitroplantas, sin ningún tipo de soporte. Los filtros consistieron en frascos de vidrio empacados con algodón quirúrgico que contenían dos tubos de cobre de 6.35 mm de diámetro interno, el primero de 13 cm de altura se utilizó para conducir el aire a la parte inferior del frasco el segundo de 5 cm se utilizó para la salida de aire. Los frascos de los BIT® y los filtros se sellaron con tapones de goma número 11 y número 10, respectivamente.

La conexión de los frascos fue mediante mangueras SURTEK® de PVC de 6.35 mm de diámetro interno conectados con conectores de cobre. El medio MS fluyó de un frasco a otro mediante la presión que se ejerció con una bomba de aire (SAP-300 SUNNY®) conectada al filtro de aire del frasco con medio MS. Para regresar el medio de cultivo se invirtió el flujo de aire (Figura 1).

### 2.3. Frecuencia y tiempo de inmersión

Con la finalidad de determinar la influencia de la frecuencia y tiempo de inmersión sobre el crecimiento de *G. skinneri* en los BIT®, se diseñó un experimento factorial de dos factores y tres niveles, obteniendo un total de nueve tratamientos. Se

utilizó un tratamiento adicional con medio semisólido con fines comparativos (Cuadro 1).



Figura 1. Biorreactores de inmersión temporal.

**Cuadro 1. Tratamientos obtenidos del diseño factorial.**

Tratamientos	Frecuencia de inmersión (h)	Tiempo de Inmersión (min)
1	24	7
2	24	14
3	24	21
4	12	7
5	12	14
6	12	21
7	8	7
8	8	14
9	8	21
10	Semisólido	Semisólido

**2.4. Evaluación de variables morfológicas**

Se evaluaron variables morfológicas sobre el crecimiento de plántulas de *G. skinneri*. Las variables consistieron en: altura de la plántula (cm), número de brotes (núm.), tamaño de brotes (mm), número de raíces (núm.), tamaño de raíces (mm), número de hojas nuevas (núm.) peso fresco (g), peso seco (mg) y contenido de humedad (%). Las mediciones para la variable humedad se hicieron siguiendo la norma oficial mexicana NMXF083-1986. Adicionalmente se evaluó semanalmente la posible presencia de contaminación y oxidación, basado en observación visual con los siguientes porcentajes: 0, 25, 50 y 100%.

**2.5. Evaluación de la cutícula**

Con la finalidad de observar el efecto de los tratamientos sobre el grosor de la cutícula de *G. skinneri* se realizaron cortes histológicos de las hojas siguiendo las técnicas de preparación y corte en micrótopo para especies vegetales (Adriano-Anaya et al., 2014), modificando los tiempos en la deshidratación y en la inclusión de parafina. La fijación e infiltración se realizó con formaldehído: alcohol etílico: agua (5:3:1:1) por 72 h. Posteriormente, las hojas se deshidrataron 2 h en una serie de soluciones de alcohol etílico de 10, 25,

50, 75 y 96 °Gay-Lussac. Las hojas se sumergieron en una serie de soluciones de xilol diluido en alcohol etílico en concentraciones de 10, 25, 50, 75 y 100 %, con un tiempo de sumersión de 1.5 h por concentración. Posteriormente se infiltró parafina histológica (Paraplast®) en los tejidos mediante inmersión por 24 h a 60 °C.

Se realizaron cortes histológicos de 10 µm en un micrótopo Microm HM 315® y posteriormente se realizó la tinción con safranina durante 1 min. Las observaciones y registro de las microfotografías se realizaron con un microscopio Axiolab® (CarlZeiss®) acoplado a un analizador de imágenes AxioVisionLE® (CarlZeiss®).

**2.6. Análisis estadístico**

Para ver diferencias estadísticas entre los tratamientos se realizó un análisis de varianzas (ANOVA), donde se encontraron diferencias estadísticas se realizó una prueba de comparación de medias (Tukey  $\alpha=0.05$ ). Los datos fueron procesados con el programa estadístico XL-STAT® ver. 2013.

**3. Resultados y Discusión**

**3.1. Frecuencia y tiempo de inmersión sobre el desarrollo de *G. skinneri***

El análisis de la variable altura de las plántulas reveló diferencias estadísticas entre los tratamientos ( $P<0.05$ ). En el Cuadro 2 se muestran todos los tratamientos, se observó que el tratamiento de 24 h y 21 min de tiempo de inmersión presentó el valor más alto para la variable altura de las plántulas (6.9 cm). Se encontraron diferencias estadísticas en el medio semisólido, el cual presentó los valores más bajos en la altura de las plántulas (5.2 cm, Figura 2), y en los tratamientos donde la frecuencia de inmersión fue de 8 h (Cuadro 2). Para la variable número de brotes el análisis reveló diferencias estadísticas en los tratamientos ( $P<0.05$ ). En el Cuadro 2. El tratamiento con mayor formación de brotes (Figura 2) fue el de 12 y 24 h con 21 min de tiempo de inmersión.

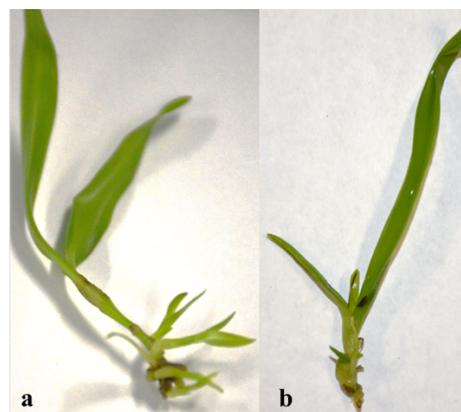


Figura 2. Plántulas de *G. skinneri* obtenidas de un biorreactor de inmersión temporal BIT® (a) y sistema convencional semisólido (b) a los 21 días de cultivo.

**Cuadro 2.** Frecuencia y tiempo de inmersión sobre variables morfológicas de las plántulas de *G. skinneri*.

Tratamiento	Frecuencia de inmersión (h)	Tiempo de inmersión (min)	Altura (cm)	Brotos (núm.)
1	24	7	6.7ab	1.2ab
2	24	14	6.5ab	0.7ab
3	24	21	<b>6.9a</b>	<b>1.8ab</b>
4	12	7	6.0ab	1.4ab
5	12	14	6.4ab	1.0ab
6	12	21	6.3ab	1.8a
7	8	7	5.4b	0.9ab
8	8	14	5.8ab	1.5ab
9	8	21	5.5b	0.6b
10	Semisólido	Semisólido	5.2b	0.4b

Para todas las variables presentadas en el Cuadro 3, no existió diferencias estadísticas entre los tratamientos ( $P > 0.05$ ).

Nuestros resultados fueron similares a lo reportado por Aguilar-Hernández et al. (2013) quienes evaluando sistemas de inmersión temporal obtuvieron mayor longitud de plántulas de *Gmelina arborea* Roxb después de 30 días de cultivo con una frecuencia de inmersión de 24 h y un tiempo

de inmersión de 1 min. Así mismo, encontraron que el tratamiento en cultivo semisólido fue que presentó los valores más bajos para esta variable. De igual forma, Castaños-Flores et al. (2017) observaron que utilizando un BIT® en semillas de *Vanilla planifolia* Jacks, obtuvo una altura de 4.10 cm y de 2.10 cm en plántulas cultivadas con medio semisólido a los 30 días de cultivo.

**Cuadro 3.** Efecto de la frecuencia de inmersión (F.I) y tiempo de inmersión (T.I) sobre el tamaño de brotes (T.B), núm. raíces, tamaño de raíces (T.R), núm. hojas, peso fresco, peso seco y humedad en las plántulas de *G. skinneri*.

F.I (h)	T.I (min)	T.B (mm)	Raíces (núm.)	T.R (mm)	Hojas (núm.)	Peso Fresco (g)	Peso seco (mg)	Humedad (%)
24	7	0.56a	0.40a	0.47a	0.77a	0.15a	0.01a	92.12a
24	14	0.42a	0.52a	0.49a	0.66a	0.12a	0.01a	93.23a
24	21	0.57a	0.43a	0.23a	0.77a	0.14a	0.01a	91.39a
12	7	0.60a	0.97a	0.39a	0.78a	0.16a	0.01a	89.81a
12	14	0.72a	0.47a	0.32a	0.80a	0.13a	0.01a	91.38a
12	21	0.45a	1.14a	0.37a	0.79a	0.15a	0.01a	92.58a
8	7	0.43a	0.28a	0.23a	0.35a	0.10a	0.01a	90.13a
8	14	0.54a	0.80a	0.34a	0.65a	0.12a	0.02a	85.58a
8	21	0.47a	0.79a	0.35a	0.53a	0.10a	0.01a	89.88a
Semisólido	Semisólido	0.21a	1.29a	0.31a	0.29a	0.17a	0.02a	86.29a

Este resultado posiblemente se debe a que en los sistemas BIT®, las plántulas se encuentran en contacto intermitente con el medio de cultivo reduciendo el nivel de toxinas presentes, ya que se mantienen limpias de sus propios exudados, lo cuales pueden perjudicar su crecimiento, al igual de que existe una renovación constante de atmósfera y una alta tasa de aireación dentro de los sistemas, lo que provoca que no exista acumulación de gases tóxicos como el etileno (Etienne y Berthouly, 2002). Uno de los efectos negativos del etileno *in vitro* es la estimulación de la generación de fenoles que al oxidarse causan oscurecimiento de los tejidos (Biddington, 1992).

Por otro lado, aunque no hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos evaluados con sistemas BIT®, la diferencia existió cuando se comparó con el medio semisólido. Este resultado es congruente con los reportes de muchos estudios. Aguilar-Hernández et al. (2013) obtuvieron mayor coeficiente de multiplicación de *Gmelina arborea* Roxb a los 30 días de cultivo utilizando un SIT (5.0) en comparación a las cultivadas en un medio semisólido (2.35). Igualmente, Vilchez y Albany (2014) obtuvieron mayor formación de

brotos de *Psidium guajava* L. en BIT® (2.17) que en un cultivo semisólido (1.78). Del mismo modo, Castaños-Flores et al. (2017) observaron que a los 30 días de cultivo se formó mayor número de brotes en un BIT® (2.23) respecto a un cultivo semisólido (2.04).

Este comportamiento puede deberse a la aireación constante que existe dentro de los sistemas BIT®, lo cual produce una disminución y ruptura de la dominancia apical debido a que la producción de auxinas en el meristemo apical se ve interrumpida, con lo cual las yemas axilares de las plántulas empiezan a desarrollarse, logrando que se vea favorecida una mayor formación de brotes y aumente el coeficiente de multiplicación (De Feria et al., 2003), de igual manera puede deberse a que la auxina es fotosensible, con lo cual, en el periodo de luz, exista una fotodegradación de la auxina, disminuyendo la concentración de la auxina (Erst et al., 2018). Lorenzo et al. (1998) mencionan que cuando las plántulas tienen mayor área de contacto con el medio, existe mayor disponibilidad de nutrientes, lo que provoca un aumento en la multiplicación de brotes y rápido crecimiento de las plantas (Levin et al., 1996).

Que el medio semisólido haya sido menos eficiente quizás se deba a que a este se le agrega un agente gelificante, haciendo que el explante se mantenga estático sobre el medio donde se lleva a cabo la absorción de nutrimentos (George et al., 2008; Lorenzo et al., 1998). Además de que las plántulas se encuentran en recipientes de cultivo cerrados, esto provoca como consecuencia también, una disminución en la turbulencia del aire, lo que conlleva a un aumento en las capas límite de las hojas y limita la entrada de CO<sub>2</sub> (Pospíšilová et al., 1999) no obstante, en el cultivo *in vitro* las plantas no son totalmente dependientes de CO<sub>2</sub> si no que utilizan el carbono en forma de sacarosa en el medio de cultivo (Dahal y Vanlerbergh, 2018).

Los diferentes parámetros dentro de los SIT pueden tener efectos específicos sobre el desarrollo del material vegetal, la frecuencia y tiempo de inmersión son parámetros decisivos para que exista un efecto positivo en la proliferación de brotes, de igual forma mejora la calidad del material vegetal (Etienne y Berthouly, 2002). Debido a esto, es posible que no se encuentren diferencias estadísticas en variables de respuesta como el tamaño y número de raíces, peso fresco, peso seco y contenido de humedad.

### 3.2. Grosor de la cutícula

Para el grosor de la cutícula a los 21 días de la siembra el análisis arrojó diferencias estadísticas en todos los tratamientos ( $P < 0.05$ ). En el Cuadro 4 se observa que las plántulas de *G. skinneri*, obtenidas del tratamiento con una frecuencia de inmersión de 8 h y un tiempo de inmersión de 14 min, el diámetro del grosor de la cutícula fue mayor (21.33  $\mu\text{m}$ ). Para esta variable, el tratamiento en medio semisólido de igual forma fue el que presentó el grosor más bajo de la cutícula comparado con todos los tratamientos (9.09  $\mu\text{m}$ ).

**Cuadro 4.** Efecto de la frecuencia y tiempo de inmersión sobre el grosor de la cutícula en las plántulas de *G. skinneri*.

Tratamiento	Frecuencia de inmersión (h)	Tiempo de inmersión (min)	Cutícula ( $\mu\text{m}$ )
1	24	7	16.128d
2	24	14	13.818e
3	24	21	17.641c
4	12	7	17.105cd
5	12	14	10.495f
6	12	21	20.124b
7	8	7	14.683e
8	8	14	<b>21.331a</b>
9	8	21	14.552e
10	Semisólido	Semisólido	9.091g

El mayor grosor de la cutícula se presentó en el tratamiento fue el de 8 h y 14 min de tiempo de inmersión temporal, este resultado puede deberse a una mayor actividad fotosintética en las plántulas de *G. skinneri* en los BIT®. La biosíntesis de cutícula se lleva a cabo en tres etapas: síntesis de *novo* de ácidos grasos, elongación de los ácidos grasos y transporte de monómeros hacia el exterior de la pared celular (Tafolla-Arellano et al., 2013). Siendo la síntesis de *novo* de ácidos

grasos uno de los aspectos que pueden inducir a un mayor grosor de cutícula, ya que la síntesis de los ácidos grasos que confirman la cutina se lleva a cabo en los cloroplastos (Byers y Gong, 2007). Las plantas *ex vitro* con cutículas gruesas tienen mayor posibilidad de adaptación ya que regulan la transpiración (Lakshanthi y Seran, 2019). Así mismo, Roels et al. (2006) y Vilchez y Albany. (2014) mencionan que la renovación del ambiente del recipiente que contiene el medio de cultivo, elimina compuestos volátiles como el etileno, promoviendo la recirculación de CO<sub>2</sub> necesaria para la fotosíntesis, mejorando el metabolismo del carbono del carbono en las hojas. Además, Muñiz (2018) menciona que las condiciones de renovación periódica de la atmósfera interna del recipiente de cultivo logran en las plantas cultivadas una mejor relación fotosintética. Georgiev et al. (2014) reportan que los altos niveles de CO<sub>2</sub> pueden tener efectos positivos en la actividad fotosintética. Del mismo modo Roels et al. (2006) obtuvieron actividad fotosintética en las plántulas de (*Musa* AAB) cultivadas en BIT® que en un cultivo en medio semisólido que no tienen actividad fotosintética, debido a la renovación del oxígeno del BIT® produciendo que las plántulas realicen dicha actividad fotosintética.

### 4. Conclusión

El uso del sistema BIT® en la micropropagación de plántulas de *G. skinneri* mejoró su desarrollo en altura, número de brotes nuevos y mayor grosor de cutícula en comparación con el medio convencional semisólido, sin embargo, no se apreciaron diferencias marcadas entre los tiempos y frecuencias de inmersión, excepto para la variable grosor de cutícula, donde el tratamiento de inmersión cada 8 horas durante 14 minutos tuvo valores significativamente mayores.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

### Referencias

- Adriano-Anaya ML, Gómez-Pérez JA, Ruiz-González S, Vázquez-Ovando JA, Salvador-Figueroa M, Ovando-Medina I. 2014. Oleosomas de semillas de *Jatropha curcas* L. como estimadores de diversidad en poblaciones del Sur de México. *Grasas y Aceites* 65(3): e031.
- Aguilar-Hernández A, Vargas-Rojas A, Hine A, Daquinta M. 2013. Multiplicación *in vitro* de *Gmelina arborea* Roxb en Sistemas de Inmersión Temporal. *Biología Vegetal* 13(3): 153-159.
- Biddington NL. 1992. The influence of ethylene in plant tissue culture. *Plant Growth Regulation* 11: 173-187.
- Byers DM, Gong H. 2007. Acyl carrier protein: structure-function relationships in a conserved multifunctional protein family. *Review/Synthese. Biochemistry and Cell Biology* 85: 649-662.
- Castaños-Flores O, Cuéllar-Zometa F, Monde de Godoy ME, Gámez-Pastrana MR, Gonzáles-Arno MT, Guevara-Valencia M, Aguilar-Rivera N. 2017. Germinación *in*

- in vitro* de senekas de *Vanilla planifolia* Jacks y comparación de métodos de micropropagación. Avances en Investigación Agropecuaria 21(2): 69-83.
- Coello Y, Miceli C, Orantes C, Dendooven L, Gutiérrez F. 2010. Plant growth regulators optimization for *in vitro* cultivation of the orchid *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressier & W.E. Higgins. Gayana Botanica 67(19): 19-26.
- Coutiño-Cortes AG, Bertolini V, Morales FA, Valle-Mora J, Iracheta-Donjuan L, García-Bautista M, Ruiz-Montoya L. 2018. El uso ornamental de *Guarianthe skinneri* (Orchidaceae), en Chiapas y Guatemala, determina parcialmente su diversidad y estructura genética. Acta Botanica Mexicana: 124: 35-48.
- Dahal K, Vanlerberghe GC. 2018. Growth at elevated CO<sub>2</sub> requires acclimation of the respiratory chain support photosynthesis. Plant Physiology 178: 82-100.
- De Feria M, Chávez M, Quiala E, Jiménez E. 2003. Efecto de la densidad de inóculo y la frecuencia de inmersión en la propagación *in vitro* de *Psidium guajava* cv. enana roja en Sistemas de Inmersión Temporal. Biotecnología Vegetal 3(3): 149-154.
- Erst A, Gorbunov A, Erst AS. 2018. Effect of concentration, method of auxin application and cultivation conditions on *in vitro* rooting of bog blueberry (*Vaccinium uliginosum* L.). Journal of Berry Research 8: 41-53.
- Etienne H, Berthouly M. 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 69: 215-231.
- Francisco-Nava JJ, Ruperto-Jiménez A, Antonia De Jesús-Sánchez A, Arenas-Ocampo ML, Ventura-Zapata E, Evangelista-Lozano S. 2011. Estudio de la morfología y aclimatación de plantas de *Laelia eyermaniana* RBCHB. f. generadas *in vitro*. Polibotánica 32: 107-117.
- George EF, Hall MA, Klerk GD. 2008. Planta propagation by tissue culture. 3rd. Edition. Springer. Pp. 19-41.
- Georgiev V, Schumann A, Pavlov A, Bley T. 2014. Temporary immersion system in plant biotechnology. Engineering in Life Sciences 1: 2-47.
- Lakshanthi JMT, Seran TH. 2019. Survival rate and growth performance of *in vitro* raised plantlets of orchid (*Dendrobium* sp.) in different hardening substrates. International Journal of Advanced Research and Review 4(3): 1-9.
- Levin R, Stav R, Alper Y, Watad AA. 1996. *In vitro* multiplication in liquid culture of *Syngonum* contaminated with *Bacillus* spp. and *Rathayibacter tritici*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 45: 277-280.
- Lorenzo JC, Gonzáles BL, Escalona M, Teisson C, Espinosa P, Borroto C. 1998. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 54: 197-200.
- Menchaca-García RA, Lozano-Rodríguez MA, Sánchez-Morales L. 2012. Estrategias para el aprovechamiento sustentable de las orquídeas de México. Revista Mexicana de Ciencias Forestales 3(13): 9-16.
- Muñiz R. 2018. La propagación *in vitro* de plantas con Sistemas de Inmersión Temporal. Una tecnología apropiada para la agricultura sustentable. Revista Tekhné 21(3): 43-50.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.
- NMX-F-083-1996. Alimentos. Determinación de humedad en productos alimenticios.
- Orellano J, Dellagiovanna A, Imanishi L, Mazzone V, Faedo NE. 2017. Sistema de Inmersión Temporal: Automatización de propagación *in vitro* de plantas utilizando herramientas libres. AAECA: 1-6
- Pineda J. 2018. Determinación de las condiciones de encapsulamiento que maximicen la germinación de *Guarianthe skinneri* (Orchidaceae). Tesis de licenciatura en Ingeniero Biotecnólogo. Instituto de Biociencias Universidad Autónoma de Chiapas, México. 12-19 Pp.
- Pospíšilová J, Tichá I, Kadleček P, Haisel D, Plzánková Š. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. Biologia Plantarum 42(2): 481-497.
- Roels S, Noceda CM, Escalona M, Sandoval J, Canal MJ, Rodríguez R, Debergh P. 2006. The effect of headspace renewal in a temporary immersion bioreactor on plantain (*Musa AAB*) shoot proliferation and quality. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 84: 155-163.
- Tafolla-Arellano JC, González-León A, Tiznado-Hernández ME, García-Zacarias L, Sañudo-Báez R. 2013. Composición, fisiología y biosíntesis de la cutícula en plantas. Revista Fitotecnica Mexicana 36(1): 3-12.
- Vilchez J, Albany N. 2014. *In vitro* multiplication of *Psidium guajava* L. in temporary immersion systems. Revista Colombiana de Biotecnología 16(2): 96-103.
- Zúñiga M, Paredes MO, Henzi X, Ascencio S, Becerra V, Baasch V. 2009. Sistema de inmersión temporal en especies anuales, frutales y vides. Fundación para la Innovación Agraria: 7-38.