



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Multiplicación Masiva de Palma Iraca
(*Carludovica palmata* Ruiz & Pav)
Mediante un Sistema Inmersión
Temporal Automatizado

Nube del Rocío Minchala Buestán

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias
Medellín, Colombia

2022

Multiplicación Masiva de Palma Iraca (*Carludovica palmata* Ruiz & Pav) Mediante un Sistema Inmersión Temporal Automatizado

Nube del Rocío Minchala Buestán

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magíster en Ciencias – Biotecnología

Director:

Ph.D., Rodrigo Alberto Hoyos Sánchez

Línea de Investigación:

Biotecnología Vegetal

Grupo de Investigación:

Biotecnología Vegetal

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias
Medellín, Colombia

2022

(Dedicatoria o lema)

A mi familia, amigos y personas especiales. No podría sentirme más agradecida por la confianza depositada en mí persona. También, a todos quienes que tengan la posibilidad de leer este trabajo, esperando sirva de ayuda en futuras investigaciones.

Si quieres vivir una vida feliz, ácala a una meta, no a una persona o cosas.

Albert Einstein

Declaración de obra original

Yo Nube del Rocío Minchala Buestán declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Nube del Rocío Minchala Buestán

Fecha 03/05/2022

Agradecimientos

Al creador, por regalarme una enorme capacidad de resiliencia, con ello, brindándome la oportunidad de disfrutar de la vida y todo lo maravilloso que hay en ella.

A mi director de Tesis el Profesor Rodrigo Hoyos Sánchez por la invitación a formar parte de su extraordinario grupo de investigación y haberme brindado todas las facilidades en el desarrollo de esta investigación.

Un reconocimiento especial al Profesor PhD. Guillermo Correa Londoño por su apoyo en la parte estadística con su ilustrado conocimiento, brindando desinteresadamente su valioso tiempo para dar soporte en el análisis de datos y revisión del documento final.

Al Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación (Minciencias) por promover y fomentar el conocimiento científico y tecnológico, al financiar el proyecto “Utilización de métodos biotecnológicos para la producción a gran escala de plántulas de Palma iraca (*Carludovica palmata* Ruiz & Pav) como alternativas productivas en la sustitución de cultivos ilícitos”

Al Ing. Segundo Maita S. PhD. por brindar su valiosa ayuda tanto moral y científica cuando más lo necesité.

Al grupo de investigación de Biotecnología Vegetal de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, por brindarme su apoyo moral, técnico y científico en cada etapa de mi formación tanto humana como profesional.

Resumen

Multiplicación masiva de palma iraca (*Carludovica palmata* Ruiz & Pav) mediante un Sistema Inmersión Temporal Automatizado

Carludovica palmata es una planta neotropical con potencial económico para la industria alimentaria, farmacéutica, agroquímica y una importante fuente de fibras para la elaboración de artesanías. Colombia, es uno de los países con mayor producción de esta especie, sin embargo, no dispone de técnicas eficientes para su multiplicación. La presente investigación desarrolló un método biotecnológico para la multiplicación a gran escala de esta planta. El método consistió en diseñar, construir y poner en marcha un Sistema de Inmersión Temporal Automatizado (SITA) tipo BIT. Se evaluó los parámetros técnicos del SITA, volumen de medio, tiempos de inmersión, frecuencias de inmersión e inóculo inicial. Se utilizó el medio MS más $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA y 20 g L^{-1} de sacarosa. El diseño experimental utilizado fue parcelas subdivididas, con 2 repeticiones. Las variables evaluadas fueron, número y longitud de brotes, número y longitud de raíces, número de hojas y biomasa. Se comparó tres sistemas de micropropagación, SITA, medio semisólido y líquido, utilizando un diseño de bloques al azar generalizado. Como resultados se obtuvo que 200 mL de medio de cultivo/biorreactor fue el más adecuado. El tiempo de inmersión óptimo fue 1 min para las variables biomasa, número y longitud de raíces e inmersión de 5 min para número de brotes. Frecuencia de inmersión de 12 h mejoró la longitud de brotes, raíces, número de hojas y biomasa, en cambio, intervalos de 6 h favoreció la proliferación de brotes y raíces. La densidad del inóculo inicial no mostró diferencias significativas. Según el módulo de optimización los valores óptimos de los parámetros del SITA fueron 1 min de inmersión, 175 mL de medio de cultivo/biorreactor, inóculo inicial de 10 explantes/biorreactor y frecuencia de inmersión de 12 h. En conclusión, se demostró que el SITA fue eficiente para la micropropagación masiva de *C. palmata* en comparación con los métodos convencionales.

Palabras clave: Iraca, *Carludovica palmata*, sistema de inmersión temporal automatizado, sistema BIT

Abstract

Massive multiplication of iraca (*Carludovica palmata* Ruiz & Pav) using an Automated Temporary Immersion System

Carludovica palmata is a neotropical plant with economic potential for the food, pharmaceutical, agrochemical industries, and an important source of fibers for making handicrafts. Colombia is one of the countries with the highest production of this species, however, it does not have efficient techniques for its multiplication. The present investigation developed a biotechnological method for the large-scale multiplication of this specie. The method consisted to design, build, and start up a TIB-type Automated Temporary Immersion System (ATIS). The technical parameters of the ATIS, medium volume, immersion times, immersion frequencies and initial inoculum were evaluated. MS-agar medium plus 1.0 mg L⁻¹ of BAP, 0.5 mg L⁻¹ of NAA and 20 g L⁻¹ of sucrose were used. The experimental design used was split plots, with 2 replications. The variables evaluated were, number and length of shoots, number and length of roots, number of leaves and biomass. Three micropropagation systems, ATIS, semi-solid and liquid medium, were compared using a generalized randomized block design. As results, it was obtained that 200 mL of culture medium/bioreactor was the most suitable. The optimum immersion time was 1 min for the biomass value, number, and length of roots, and 5 min immersion for the number of shoots. Immersion frequency of 12 h improved the length of shoots, roots, number of leaves and biomass, on the other hand, intervals of 6 h favored the proliferation of shoots and roots. The density of the initial inoculum did not show significant differences. According to the optimization module, the optimal values of the ATIS parameters were 1 min of immersion, 175 mL of culture medium/bioreactor, initial inoculum of 10 explants/bioreactor and immersion frequency of 12 h. In conclusion, ATIS was shown to be efficient for massive micropropagation of *C. palmata* compared with conventional methods.

Keywords: Iraca, *Carludovica palmata*, Automated Temporary Immersion System, BIT system

Contenido

Pág.

Resumen	IX
Lista de figuras	XIV
Lista de tablas	XVII
Introducción	1
1. Marco teórico	3
1.1 <i>C. palmata</i>	3
1.1.1 Descripción de la especie	3
1.1.2 Importancia económica	4
1.2 Cultivo de tejidos vegetales	5
1.2.1 Métodos de micropropagación de plantas	6
1.3 Medio de cultivo	8
1.3.1 Reguladores de crecimiento	9
1.3.2 Medio de cultivo Murashige y Skoog (MS)	10
1.4 Tipos de medios de cultivo	11
1.4.1 Medio de cultivo semisólido	11
1.4.2 Medios de cultivo líquido	11
1.5 Nuevas técnicas de propagación <i>in vitro</i>	11
1.5.1 Diseño y operación del SIT	12
1.5.2 Funcionamiento del sistema RITA	13
1.5.3 Funcionamiento del sistema Twin-Flask (BIT)	14
1.5.4 Generaciones de los BIT	16
2. Objetivos	19
2.1 Objetivo general	19
2.1.1 Objetivos específicos	19
3. Materiales y Métodos	21
3.1 Materiales	21
3.1.1 Reactivos	22
3.2 Metodología	22
3.2.1 Construcción del SITA Twin-Flask (BIT)	22
3.2.2 Descripción del SITA	27
3.3 Metodología para la micropropagación de <i>C. palmata</i> utilizando el SITA	31
3.3.1 Obtención del material vegetal	31
3.3.2 Preparación del explante	31
3.3.3 Medio de cultivo	32

3.3.4	Desarrollo del experimento.....	32
3.3.5	Factores en estudio.....	32
3.3.6	Las variables de respuesta fueron.....	33
3.3.7	Diseño experimental.....	33
3.3.8	Análisis estadístico.....	34
4.	Resultados y discusión.....	35
4.1	Número de brotes por explante.....	35
4.1.1	Tiempo de inmersión para número de brotes.....	35
4.1.2	Frecuencia de Inmersión para el número de brotes por explante.....	36
4.1.3	Volumen del medio de cultivo para número de brotes por explante.....	37
4.1.4	Densidad de explantes para número de brotes por explante.....	39
4.2	Variable de respuesta longitud del brote.....	40
4.2.1	Tiempo de inmersión para longitud del brote.....	41
4.2.2	Frecuencia de inmersión para longitud del brote.....	42
4.2.3	Volumen de medio de cultivo para longitud del brote.....	43
4.2.4	Densidad de explantes para longitud del brote.....	44
4.3	Variable de respuesta número de raíces.....	45
4.3.1	Tiempo de inmersión para número de raíces por explante.....	45
4.3.2	Frecuencia de inmersión para número de raíces por explante.....	46
4.3.3	Volumen de medio de cultivo para número de raíces por explante.....	47
4.3.4	Densidad de explantes para la variable número de raíces.....	48
4.4	Variable de respuesta longitud de raíces.....	49
4.4.1	Tiempo de inmersión para longitud de raíces por explante.....	49
4.4.2	Volumen del medio de cultivo para longitud de raíces por explante.....	50
4.4.3	Frecuencia de inmersión para longitud de raíces por explante.....	51
4.4.4	Densidad de explantes para longitud de raíces por explante.....	52
4.5	Variable de respuesta número de hojas.....	52
4.5.1	Tiempo de inmersión para número de hojas.....	53
4.5.2	Frecuencia de inmersión para número de hojas.....	53
4.5.3	Volumen de medio de cultivo para número de hojas.....	54
4.5.4	Número de explantes para número de hojas.....	56
4.6	Variable de respuesta peso seco del cultivo.....	56
4.6.1	Tiempo de inmersión para peso seco del cultivo.....	56
4.6.2	Frecuencia de inmersión para peso seco del cultivo.....	57
4.6.3	Volumen de medio de cultivo para peso seco del cultivo.....	58
4.6.4	Densidad de explantes para peso seco del cultivo.....	58
4.7	Análisis mediante superficie de respuestas.....	59
4.7.1	Valores óptimos estimados para número de brotes por explante.....	59
4.7.1	Valor óptimo estimado para la variable longitud del brote.....	60
4.7.1	Valor óptimo estimado para la variable número de raíces por explante.....	60
4.7.1	Valor óptimo estimado para la variable longitud de raíces.....	61
4.7.1	Valor óptimo estimado para la variable número de hojas por explante.....	62
4.7.2	Valor óptimo estimado para la variable biomasa.....	63
4.8	Análisis de correlación.....	64
4.9	Optimización de múltiples variables de respuesta.....	65
4.10	Comparación de tres métodos de micropropagación.....	66
4.10.1	Número de brotes por explante.....	66
4.10.2	Longitud del brote.....	67
4.10.3	Número de raíces.....	69
4.10.4	Longitud de las raíces.....	70

4.10.5 Número de hojas	72
4.10.6 Peso seco del cultivo	73
5. Conclusiones y recomendaciones.....	77
5.1 Conclusiones.....	77
5.2 Recomendaciones.....	79
A. Anexo: Análisis de varianza para la variables de respuesta número de brotes por explante.....	81
B. Anexo: Análisis de varianza para la variables de respuesta longitud de brotes.....	81
C. Anexo: Análisis de varianza para la variables de respuesta número de raíces por explante.....	82
D. Anexo: Análisis de varianza para la variables de respuesta longitud de raíces.....	82
E. Anexo: Análisis de varianza para número de hojas por brote	83
F. Anexo: Análisis de varianza para peso seco del cultivo	83
G. Anexo: Análisis de varianza para seis variables de respuesta en la micropropagación de <i>C. palmata</i> utilizando tres sistemas de cultivo <i>in vitro</i>.....	84
H. Anexo: Características de brotes de <i>C. palmata</i> en tres sistemas de cultivo <i>in vitro</i>	84
Referencias.....	85

Lista de figuras

Pág.		
Figura 1-1:	Principales métodos de micropropagación de plantas.....	6
Figura 1-2:	Diseño tecnológico y funcionamiento del sistema RITA	13
Figura 1-3:	Diseño tecnológico y principio operativo del sistema Twin-Flask:.....	15
Figura 3-1:	Modelo lógico del SITA	23
Figura 3-2:	Estructura física del SITA desarrollado.....	24
Figura 3-3:	Implementación de la tubería del SITA.....	25
Figura 3-4:	Mangueras utilizadas para conectar la tubería con los biorreactores	25
Figura 3-5:	Biorreactores de inmersión temporal automatizado Twin-Flask.....	26
Figura 3-6:	Controladores Lógicos Programables (PLCs) del SITA	27
Figura 3-7:	Control de acceso a la aplicación Smart BIT 3.0.	28
Figura 3-8:	Interfaz amigable del SITA tipo BIT 3.0. construido	30
Figura 3-9:	Temporizador DIGImecBNDS-X2.....	30
Figura 3-10:	Explantos utilizados en el experimento.....	31
Figura 4-1:	Interacción de segundo orden: frecuencia, tiempo de inmersión y volumen de medio por biorreactor, para la variable de respuesta número de brotes	36
Figura 4-2:	Efecto de la frecuencia de inmersión y el volumen del medio de cultivo en la generación de brotes de <i>C. palmata</i>	37
Figura 4-3:	Efecto del Volumen de medio en la micropropagación de <i>C. palmata</i> mediante un BIT.....	39
Figura 4-4:	Interacción de segundo orden: Frecuencia de inmersión, número de explantes por biorreactor y volumen de medio por biorreactor, para la variable de respuesta número de brotes	40
Figura 4-5:	Efecto de la frecuencia de inmersión en la longitud de brotes de <i>C. palmata</i>	43
Figura 4-6:	Interacción de segundo orden: Frecuencia de inmersión, tiempo de inmersión y volumen de medio por biorreactor, para longitud del brote.....	44
Figura 4-7:	Interacción de segundo orden: número de explantes por biorreactor, volumen de medio por biorreactor y tiempo de inmersión, para la variable de respuesta número de raíces	46
Figura 4-8:	Efecto de la frecuencia de inmersión en la generación de raíces de <i>C. palmata</i>	47
Figura 4-9:	Interacción de segundo orden: Frecuencia de inmersión, número de explantes por biorreactor y volumen de medio por biorreactor, para la variable de respuesta número de raíces.....	48

Figura 4-10: Interacción de segundo orden: Frecuencia de inmersión , volumen de medio por biorreactor y número de explantes por biorreactor, para la variable de respuesta número de raíces	49
Figura 4-11: Influencia del tiempo y frecuencia de inmersión en el crecimiento del sistema radical de <i>C. palmata</i>	50
Figura 4-12: Interacción de segundo orden: frecuencia de inmersión, tiempo de inmersión y volumen de medio por biorreactor para la variable longitud de raíces	51
Figura 4-13: Interacción de primer orden: volumen de medio por biorreactor y número de explantes por biorreactor, para la variable longitud de las raíces.....	52
Figura 4-14. Interacción de primer orden: tiempo de inmersión y frecuencia de inmersión, para la variable de respuesta número de hojas por explante	54
Figura 4-15: Interacción de primer orden: tiempo de inmersión y volumen de medio de cultivo por explante, para la variable de respuesta número de hojas por explante	55
Figura 4-16: Influencia de la frecuencia y volumen de medio de cultivo en la inducción de hojas de <i>C. palmata</i>	55
Figura 4-17: Efecto de la frecuencia de inmersión en el incremento del peso seco de <i>C. palmata</i>	57
Figura 4-18: Interacción de tercer orden: frecuencia, tiempo de inmersión, número de plantas por biorreactor y volumen de medio de cultivo por biorreactor, para la variable de respuesta Biomasa.....	58
Figura 4-19: El diagrama de Pareto estandarizado para la variable número de brotes por explante de <i>C. palmata</i> a los 60 días de cultivo <i>in vitro</i>	59
Figura 4-20: El diagrama de Pareto estandarizado para la variable longitud de brotes por explante de <i>C. palmata</i> a los 60 días de cultivo <i>in vitro</i>	60
Figura 4-21: El diagrama de Pareto estandarizado para la variable número de raíces por explante de <i>C. palmata</i> a los 60 días de cultivo <i>in vitro</i>	61
Figura 4-22: El diagrama de Pareto estandarizado para la variable longitud de raíces por explante de <i>C. palmata</i> a los 60 días de cultivo <i>in vitro</i>	62
Figura 4-23: El diagrama de Pareto estandarizado para la variable número de hojas por brote de <i>C. palmata</i> a los 60 días de cultivo <i>in vitro</i>	63
Figura 4-24. El diagrama de Pareto estandarizado para la variable peso seco de <i>C. palmata</i> a los 60 días de cultivo <i>in vitro</i>	64
Figura 4-25. Correlaciones más representativas entre las seis variables de respuesta analizadas	65
Figura 4-26: Brotes de <i>C. palmata</i> regenerados en tres sistemas se cultivo	67
Figura 4-27: Diferencias en longitudes de brotes de <i>C. palmata</i> obtenidos en tres sistemas de cultivo <i>in vitro</i>	69
Figura 4-28: Influencia del sistema de cultivo <i>in vitro</i> en la inducción de raíces de <i>C. palmata</i>	70
Figura 4-29: Influencia de tres sistemas de cultivo <i>in vitro</i> en el desarrollo del sistema radical en <i>C. palmata</i>	71
Figura 4-30: Influencia de tres métodos de micropropagación en el número de hojas de <i>C. palmata</i> a los 60 días después de la siembra	72

Figura 4-31: Comportamiento de las variables a tres sistemas de cultivo en la micropropagación de *C. palmata* 74

Figura 4-32: Propagación de *C. palmata* en tres sistemas de cultivo *in vitro* 75

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1-1:	Características de un sistema de inmersión tipo RITA	14
Tabla 1-2:	Características de un sistema de inmersión temporal Twin-Flask (BIT).....	16
Tabla 3-1:	Materiales y equipos del sistema de inmersión automatizado	21
Tabla 3-2:	Reactivos utilizados en la preparación del medio de cultivo, para la propagación masiva de <i>C. palmata</i>	22
Tabla 3-3:	Factores en estudio.....	33
Tabla 4-1:	Valores óptimos de los factores para obtener 11,21 brotes por explante...	59
Tabla 4-2:	Valores óptimos de los factores para obtener una longitud de brote máxima de 2.51 cm, según el módulo de optimización.	60
Tabla 4-3:	Valores óptimos para obtener 15,65 raíces por explante.....	61
Tabla 4-4:	Valores óptimos para obtener una longitud máxima de raíces de 1,53 cm	62
Tabla 4-5:	Valores óptimos de los factores para obtener 3, 49 hojas por brote	63
Tabla 4-6:	Valores óptimos para conseguir 1, 28 g de peso seco	64
Tabla 4-7:	Valores de ponderación asignados a cada variables de respuesta evaluada en la micropropagación de <i>C. palmata</i>	65

Introducción

Carludovica palmata Ruiz & Pav (iraca) es una planta que pertenece a la familia Cyrtanthaceae, se encuentra distribuida desde el centro hacia el sur de América, es considerada como una de las especies emblemáticas de la etnobotánica neotropical (Tuberquia, 2019) ya que posee una estrecha relación con el hombre, misma que se mantiene hasta la actualidad por su gran versatilidad, siendo el producto más importante su fibra (Checa y Ortiz, 2014).

Colombia, uno de los principales productores de esta especie (Gálvizet al., 2021). Siendo los habitantes del departamento de Nariño (Municipios de Sandoná, Colon, Linares y Sotomayor), Caldas (Municipios de Aguadas), Huila (Municipio de Suaza) conservan una larga tradición en la elaboración de una gran variedad de artesanías a base de iraca (Checa y Ortiz, 2014; Gálvizet al., 2019), en el municipio de Usiacurí (Atlántico) la mayoría de sus habitantes viven de la tejeduría y comercialización de artículos derivados de esta planta (Arteaga y Orozco, 2015).

Se sabe que *C. palmata* fue utilizada por los pueblos originales desde la época precolombina para la fabricación de cestas, esteras, escobas, techos, sombreros y otros productos. En la actualidad esta especie ha adquirido considerable importancia económica debido a que cada una de sus partes pueden ser aprovechadas de diferente manera, ya sea en la agroindustria alimentaria como fuente de palmito a menor costo (Álvarez, 2014), en la industria química, farmacéutica y cosmética como fuente potencial de compuestos fenólicos (Gálviz et al., 2019; 2021), en la industria artesanal como fuente de fibra (Checa y Ortiz, 2014) y en la industria petroquímica como biorremediador de suelos contaminados (Garcés et al., 2017).

Debido a la necesidad de proveer plántulas como material de siembra de alta calidad fitosanitaria para proyectos productivos, donde actualmente se requiere de esta materia prima (Muñoz y Tuberquía, 1999; Gálviz et al., 2019), es imprescindible la búsqueda de métodos más eficientes de multiplicación y producción de plantas para implementar

cultivos de iraca a gran escala. Los avances realizados para la multiplicación utilizando técnicas biotecnológicas como la micropropagación, aun no son suficientes para garantizar una multiplicación a gran escala (Hoyos y Chicaíza, 2019), por lo que se hace necesario buscar y mejorar las condiciones de escalamiento en la producción del material vegetal de siembra.

Los Sistemas de Inmersión Temporal Automatizados (SITA) han sido utilizados con éxito en la micropropagación a gran escala de varias especies vegetales (Villamarín et al., 2019; Martínez et al., 2019; Aka et al., 2020). Estos sistemas, controlan el suministro de nutrientes, oxígeno (O_2), dióxido de carbono (CO_2) y eliminación de etileno (Etienne y Berthouly, 2002; Vives, y otros, 2017), generando condiciones naturales para la morfogénesis del material vegetal micropropagado (Uma et al., 2021). En comparación con los sistemas de cultivo sólido y líquido, los SITA han sido reportados que incrementan las tasas de proliferación de brotes y reducen los costos de producción (Chávez, y otros, 2018).

Implementar un SITA que facilite la multiplicación masiva de *C. palmata*, requiere adquirir estos equipos en el extranjero con un alto costo, por lo que esta tecnología no se ha introducido en países en vía de desarrollo (Sólorzano, 2016). En este contexto, existe la necesidad de diseñar, construir y poner en marcha biorreactores de inmersión temporal de bajo costo, con igual o mejor eficiencia que los prototipos comerciales.

Con el presente proyecto se pretende diseñar, construir y poner en funcionamiento un SITA tipo Twin-Flask (BIT), así mismo evaluar las mejores condiciones de operación (tiempos y frecuencias de inmersión del material vegetal en el medio de cultivo, volumen de medio y densidades de explantes por biorreactor) para establecer un protocolo eficiente de propagación masiva de *C. palmata in vitro*, generando una alternativa a la carencia de material vegetal de calidad para la repoblación de zonas productoras de esta especie y consecuentemente favorecer a las comunidades rurales de varios departamentos de Colombia como Nariño, Cauca, Antioquia y Chocó que demandan esta materia prima en la elaboración de artesanías y abastecer a las diferentes potenciales industrias.

1. Marco teórico

1.1 *C. palmata*

1.1.1 Descripción de la especie

Los botánicos farmacéuticos españoles Hipólito Ruiz y José Antonio Pavón en 1794 registraron por primera vez a la planta de iraca dentro de su obra “*Florae Peruvianae et Chilensis*”, bajo el nombre científico *Carludovica palmata*; el nombre del género, *Carludovica*, en honor al Rey Carlos IV de Borbón y a su esposa María Luisa de Parma; el epíteto, *palmata*, en mención a la forma de sus hojas semejantes a las palmeras (Mutis, Galeano y Bernal, 1985).

Ruiz y Pavón clasificaron a esta especie dentro de la familia *Arecaceae* y recién en el siglo XVIII, fue introducida a la familia *Cyclanthaceae*, las especies pertenecientes a este grupo poseen hojas con aspecto como de palmas, pero no guardan ninguna relación evolutiva cercana con este grupo (Muñoz y Tuberquía, 1999). No obstante, frecuentemente a la iraca se le confunde con una palma y a menudo se suele referir a esta planta como “palma de iraca”.

C. palmata es una planta monoica, monocotiledónea, de raíz fasciculada, sin tallo evidente por encima del suelo. Con pecíolos de hojas cilíndricos, acanalados de color verde pueden medir hasta dos metros de largo y emergen directamente de los rizomas. La lámina foliar es flabelada en forma de abanico, con una longitud de uno a tres metros de largo y menos de un metro de ancho dividida en tres a cuatro segmentos con márgenes lobulares, a la hoja joven y compacta se le conoce como cogollo. La inflorescencia es un espádice de aproximadamente 30 cm de largo, con un raquis más o menos carnoso y subtendido por espatas, nacen de las axilas de las hojas y el fruto es una baya de color rojo con numerosas semillas (Sehremmer, 1982; Bennett et al., 1992; Ortega, 2016).

La reproducción de *C. palmata* por vía sexual es lenta y presenta una baja tasa de germinación de semillas, probablemente asociado a la mala polinización (Gómez et al., 2011). Por ello, es preferido y ampliamente conocido la multiplicación vegetativa (asexual) por medio de rizomas o tallos subterráneos (González et al., 2004), sin embargo, esta técnica también presenta sus limitaciones, debido a que no permite una amplia tasa de

multiplicación, ya que el número de rizomas está íntimamente ligado a la capacidad natural de la planta para producirlos (Córdoba y Portilla, 2005; Graca et al., 2014), además, la integridad de la planta madre se ve comprometida, debido a las múltiples heridas generadas al momento de retirar los propágulos, mismos que se convierten en sitios de infección por patógenos. Por ello, esta forma de multiplicación es considerada la principal fuente de dispersión de plagas y enfermedades. Todo lo mencionado ha provocado una baja producción de materia prima de buena calidad, afectando negativamente la cadena productiva artesanal (Checa y Ortiz, 2014).

1.1.2 Importancia económica

C. palmata es una especie emblemática de la etnobotánica y botánica económica en todos los países donde se encuentra distribuida, en virtud de su alta versatilidad y cercanía con los grupos étnicos originarios de la región neotropical quienes han aprovechado de las bondades de esta planta (Tuberquia, 2019). En la actualidad esta especie ha adquirido considerable importancia económica debido a su gran versatilidad, ya que puede ser aprovechada en la agroindustria alimentaria como colorante, conservante, aditivo y fuente de palmito de menor costo (Álvarez, 2014; Murillo et al., 2021); en la industria química, para generar papel artesanal y como alternativa importante para el refuerzo de matrices poliméricas (Muñoz y Tuberquía, 1999; Moo et al., 2019); en la farmacéutica y cosmética como fuente potencial de metabolitos secundarios, mismos que son conocidos como antiinflamatorios, antioxidantes, antimicrobianos, entre otros (Gálvizet al., 2019; 2021; Murillo et al., 2021) y en la fitorremediación de suelos contaminados (Garcés et al., 2017). Además, ha mostrado ser un excelente sustituto de la Palma de Cera (*Ceroxylon quindiuense*) para utilizar en la celebración católica del Domingo de Ramos, en algunos municipios del país ya es popular utilizar las hojas de *C. palmata* con este fin (Tuberquia, 2019).

Por ello, *C. palmata* es una especie de gran potencial económico para muchas familias que residen en las zonas rurales, quienes cuentan hoy en día con una actividad agro-artesanal como su principal fuente de ingresos. Esto gracias a la creciente demanda tanto local como internacional de artesanías y sombreros de alta filigrana, resultando económicamente rentable para todas aquellas personas involucradas en dicha actividad (Harlyng et al., 1998; Checa y Ortiz, 2014).

1.2 Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) o cultivo *in vitro* de plantas es la técnica biotecnológica que permite un eficiente crecimiento y desarrollo de tejidos, órganos, células y protoplastos aislados de una planta madre (explante) dentro de frascos de vidrio, utilizando medio de cultivo nutritivo artificial axénico adecuado e incubado bajo condiciones ambientales controladas (Roca y Groginski, 1993; Sharry, Adema, y Abedini, 2015).

Esta técnica tiene como base la totipotencia celular, misma que es definida como la capacidad de las células vegetales de ser estimuladas adecuadamente para ser autosuficientes y poder regenerarse en un nuevo individuo idéntico al progenitor (Tirado y Perea, 2011). Todos los explantes experimentan procesos de desdiferenciación y diferenciación celular y siguen diferentes vías, tales como: callogénesis, organogénesis, embriones somáticos, entre otros, para dar origen a la formación de nuevos propágulos, acción que permite obtener respuestas de gran interés en el área de Biotecnología Vegetal (Roca y Groginski, 1993). Esto mediante el uso adecuado de biorreguladores, mensajeros químicos que actúan induciendo una serie de reacciones a nivel intercelular, lo que origina cambios a nivel fisiológico, genético y morfológico en el material vegetal de partida (Perea et al., 2009).

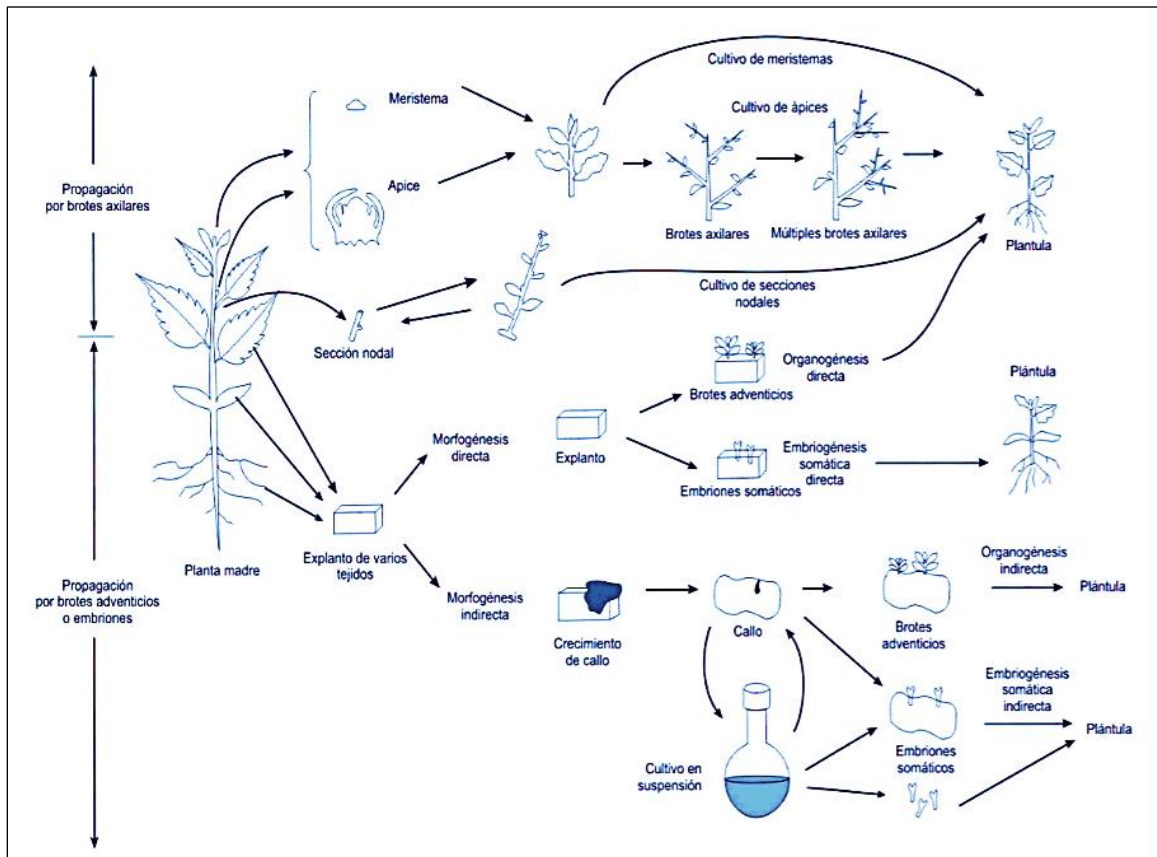
El CTV ha creado métodos alternativos exitosos de manejo agronómico logrando revolucionar los sistemas de producción agrícola, donde la micropropagación de plantas es una de las técnicas de mayor impacto a nivel mundial, ya que permitido clonar y multiplicar un sin número de especies sin la necesidad de disponer de semillas o grandes cantidades de propágulos como en otros métodos de propagación asexual. Así, el CTV permite obtener un gran número de plantas genéticamente idénticas en un menor tiempo, en comparación con las técnicas de propagación tradicionales (Sharry, Adema, y Abedini, 2015).

Entre las ventajas más relevantes del CTV se encuentran la posibilidad de producir en cualquier época del año sin depender de las condiciones medio ambientales, sanear material vegetal infectado por patógenos vasculares y controlar la diseminación de plagas y enfermedades al garantizar un material de siembra libre de agentes fitopatógenos (Sharry, Adema, y Abedini, 2015).

1.2.1 Métodos de micropropagación de plantas

Existe una gran variedad de métodos de micropropagación de plantas. Al momento de elegir el método más eficiente se debe considerar los siguientes factores: Tipo de explante, plasticidad celular, uso eficiente de biorreguladores y tecnología disponible (Tirado y Perea, 2011; Vilchez y Albany, 2014). La Figura 1-1 ilustra las diferentes vías teóricas disponibles para la propagación de plantas *in vitro*.

Figura 1-1: Principales métodos de micropropagación de plantas



Fuente: Tirado y Perea, 2011

- Cultivo de meristemas

El meristemo es un tejido de las plantas en constante división celular y posee la mayor cantidad de células totipotentes. Se considera meristemos en sentido estricto al domo meristemático del ápice o bien este con uno o dos primordios foliares, el cual es utilizado esencialmente para la generación de plantas libres de patógenos. La carencia de vías de conducción para viroides en este tipo de tejidos permite obtener material vegetal sano

(Perea et al., 2009). Esta técnica consiste en la disección e incubación del meristemo apical de yemas terminales, laterales o axilares, favorecido por la presencia de citocininas en el medio de cultivo. Este método de propagación permite obtener una rápida multiplicación clonal y es utilizado en una gran variedad de especies (Contreras, 2016).

Existen tres tipos de meristemos. Los apicales generan el crecimiento en longitud de la planta, están localizados en los ápices de brotes y raíces, tanto en el eje principal como en los laterales y se originan en la embriogénesis. Meristemos laterales (cámbium vascular y felógeno) permiten un crecimiento en diámetro o grosor y se diferencian después de la germinación (Tirado y Perea, 2011). Los meristemos intercalares que se encuentra entre las regiones diferenciadas. El crecimiento en longitud del tallo no depende exclusivamente del meristemo apical, sino de los meristemos intercalares. Estos se encuentran en todos los tallos de estructura primaria que están articulados en nudos y entrenudos (Perea y Tirado, 2009; Contreras, 2016).

- Organogénesis

Organogénesis o caulogénesis es considerado una de las fases más importante del CTV, mismo que se puede desarrollar de forma directa o indirecta (Tirado y Perea, 2011):

Organogénesis directa consiste en la regeneración de nuevos individuos a partir de yemas axilares preexistentes o la formación de yemas de novo a partir de tejido no meristemático, sin el crecimiento intermediario de células de callo, a través, de eventos morfogénicos como: adaptación del explante, desarrollo de un meristemoide, crecimiento de una yema (meristemo caulinar) y la elongación del tallo. Tejidos con alto grado de juvenilidad y células con bajos niveles de diferenciación presentan mayor probabilidad de regeneración mediante esta vía. La principal ventaja de este método de micropropagación es que los nuevos individuos presentan gran estabilidad genética (Tirado y Perea, 2011; Sharry, Adema, y Abedini, 2015; Suáres, 2020).

Organogénesis indirecta esto ocurre cuando la regeneración del material vegetal inicia a partir de una capa de callo (unipolar con conexión vascular a la planta madre). El balance adecuado entre citoquininas y auxinas determinaran la capacidad morfogénica del callo (Tirado & Perea, 2011; Sharry, Adema, y Abedini, 2015).

- Embriogénesis somática

Esta técnica consiste en la formación de embriones fuera del saco embrionario a partir de células somáticas sin la necesidad de la fusión de gametos para posteriormente regenerarse en plántulas. Comparten características comunes con los embriones cigóticos como es la bipolaridad, carecen de conexiones vasculares con el tejido materno y siguen la misma secuencia morfológica durante la embriogénesis, estado de preembrión, globular, corazón, torpedo y cotiledonar (Guillermo, Angarita y Mosquera, 2003). Este fenómeno (apomixis) no es una técnica exclusiva de micropropagación, ya que se puede observar en algunas especies vegetales en condiciones *in vivo* (Sharry, Adema, y Abedini, 2015).

La formación de embriones somáticos puede ocurrir de dos formas, directa e indirecta, en el primer caso, las células del explante son la fuente de los embriones somáticos sin que haya una etapa de callo. La indirecta ocurre cuando los embriones somáticos se forman a partir de un tejido no organizado (callo) (Roca y Groginski, 1993; Suárez, 2020). Esta vía de regeneración de plantas presenta mayor riesgo de variación somaclonal, por ello, es utilizado principalmente en mejoramiento genético y no en la micropropagación (Galan et al., 2018).

1.3 Medio de cultivo

La composición del medio de cultivo es uno de los factores importante que gobierna el crecimiento y desarrollo morfológico de los tejidos *in vitro*. La técnica del CTV demanda una gran variedad de nutrientes, similares a los que proporciona el suelo en condiciones naturales. Generalmente los componentes de un medio de cultivo nutritivo son: agua, compuestos inorgánicos, orgánicos y materiales de soporte. El 95 % del medio de cultivo está compuesto por agua, sirve como solvente de todos los solutos, el 5 % faltante son macroelementos (nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre) y microelementos (hierro, manganeso, zinc, boro, cobalto, molibdeno y cobre), además, de compuestos orgánicos como: carbohidratos, vitaminas, reguladores de crecimiento y en algunas ocasiones agentes gelificantes (Sharry, Adema y Abedini, 2015).

La sacarosa ($C_{12}H_{22}O_{12}$) es el carbohidrato más utilizado en el CTV, se adiciona generalmente en una concentración del 2 al 4%. Las vitaminas como Tiamina (Vitamina B1), Acido nicotínico (Niacina), Piridoxina (Vitamina B6), Acido ascórbico (Vitamina C) y Mio-inositol son adicionadas ya que participan en una serie de reacciones catalíticas del

metabolismo. La tiamina es la única considerada esencial debido a que participa en el ciclo de los ácidos orgánicos en la respiración (Perea et al., 2009).

1.3.1 Reguladores de crecimiento

El término reguladores de crecimiento es utilizado para referirse a sustancias químicas de origen natural (hormonas) y sintético (laboratorio) que inducen una respuesta en el vegetal. Los tejidos *in vitro* generalmente no producen las cantidades necesarias de hormonas para realizar cada uno de sus procesos fisiológicos, por lo que se hace necesario suplementar de forma exógena (Contreras, 2016). Dependiendo del objetivo a alcanzar, de la especie vegetal y tipo de explante, se utilizan tres grupos principales auxinas, citoquininas y giberelinas.

- Auxinas

Las Auxinas son indispensables para el crecimiento y desarrollo de los vegetales y se encuentran distribuidas por toda la planta. Los efectos más destacados de este grupo de fitohormonas son la dominancia apical, desarrollo meristemático, formación de raíces adventicias, estimula la formación de tejido no diferenciado, inducción de embriones somáticos y la elongación celular (Rojas y Ramírez, 1990; Tirado y Perea, 2011; Khan, Rozhon, y Poppenberger, 2014).

El ácido indolacético (AIA) es la auxina natural predominante. Se sintetizan a partir del aminoácido triptófano en el ápice del tallo, semilla en desarrollo y hojas jóvenes y en general en los meristemos. El transporte de las auxinas endógenas se efectúa célula a célula, de manera unidireccional (basipétalo) (Rojas y Ramírez, 1990). Se han desarrollado auxinas sintéticas ampliamente utilizadas en el área de CTV, los más populares son el ácido indol butírico (AIB), ácido naftalén acético (ANA) y el ácido 2,4-diclorofenoxi acético (2,4-D) (Tirado y Perea, 2011; Vega et al., 2016).

- Citoquininas

Las citoquininas se sintetizan a partir del isopentenil adenosina fosfato (derivado de la ruta del ácido mevalónico), tienen la capacidad de promover la división celular acortando la fase S o síntesis del ADN y estimulando la entrada de la fase M del ciclo celular. Su síntesis se da principalmente en la raíz y su efecto principal en las yemas del tallo (Rojas & Ramírez, 1990). Actúan como reguladores maestros del crecimiento de las plantas y

desempeñan un papel importante en diversos procesos de desarrollo, incluida la formación de novo de brotes, la diferenciación de hojas y raíces, actúan en la interrupción de la dominancia apical, diferenciación de cloroplastos, la organización y diferenciación de callo y son antagonistas de la senescencia (Taiz y Zeiger, 2006; Khan, Rozhon y Poppenberger, 2014).

La zeatina y el 2-isopenteniladenina (2iP) son las citoquininas naturales producidas por excelencia, sin embargo se puede encontrar sustitutos de origen sintético como benzilaminopurina (BAP), kinetina y el tidiazuron (TDZ). De todos estos compuestos, BAP es la más utilizada en cultivo in vitro, especialmente en la multiplicación de meristemas y organogénesis (Perea et al., 2009; Khan, Rozhon, & Poppenberger, 2014).

- Giberelinas

Las giberelinas son terpenos sintetizados como una ramificación de la ruta terpenoide, su síntesis se produce en todos los tejidos de los diferentes órganos de una planta. Estas sustancias promueven la división y alargamiento celular al incrementar la plasticidad de la pared celular. Su síntesis ocurre principalmente en las hojas jóvenes (Taiz y Zeiger, 2006).

Existen alrededor de 90 giberelinas, pero de las activas, la más comúnmente utilizada en CTV es el ácido giberélico (GA3), el cual mejora la germinación de semillas, floración, movilidad del endospermo, expansión foliar, desarrollo foliar, acortamiento de la fase juvenil, la elongación de tallos y la conversión de embriones somáticos en plantas. Sin embargo, se ha observado un efecto inhibitorio en formación de nuevos tallos y raíces, inducción de tejidos embriogénicos, siendo contraproducente su uso en eventos de multiplicación de brotes. GA3 es alterado en su estructura por el calor, por lo que es mejor esterilizar a través de filtración (Perea et al., 2009; Zulfiqar et al., 2019).

1.3.2 Medio de cultivo Murashige y Skoog (MS)

Los científicos Murashige y Skoog (1962) desarrollaron una formulación de medio de cultivo rico en iones de amonio NH_4^+ , nitrato NO_3^- , cloro Cl^- y Molibdato MoO_4 y bajas concentraciones de Calcio Ca , Fosfato PO_4^- , Magnesio Mg^+ y Cobre Cu^{++} en comparación con otros medios, logrando incrementar significativamente el desarrollo de los tejidos vegetales (Martínez et al., 2015). Hasta la actualidad el medio MS es el más usado en el CTV, composición que puede ser modificada de acuerdo con los requerimientos de cada especie. El medio MS básico no puede suplir los requerimientos para el desarrollo

adecuado de las células vegetales, siendo indispensable agregar antioxidantes, aminoácidos, retardantes, biorreguladores, entre otros, para obtener las respuestas deseadas en el explante (Tirado & Perea, 2011; Suárez, 2020).

1.4 Tipos de medios de cultivo

1.4.1 Medio de cultivo semisólido

Son aquellos que contienen algún agente gelificante en su composición con la finalidad de dar soporte a los explantes, los nutrientes son absorbidos únicamente por el extremo que entra en contacto con el medio nutritivo, haciendo necesario mayor tiempo para el desarrollo del vegetal. Algunos estudios han demostrado que la micropropagación en medio semisólido ha dejado de ser un proceso económicamente eficiente, coincidiendo que la causa fundamental es debida al uso de agentes gelificantes y el elevado número de operaciones manuales, lo que implica altos costos de producción (Martínez et al., 2019).

1.4.2 Medios de cultivo líquido

Son medios sin agente gelificante en su formulación, se caracteriza por proveer condiciones uniformes de cultivo, los beneficios mayormente reportados son la reducción del número de subcultivos e incremento en la tasa de crecimiento, debido a que una mayor superficie del explante entra en contacto con el medio nutritivo (Mancilla et al., 2021). Además, de presentar menor gradiente de difusión y mínima resistencia al ingreso del agua a las células del explante, facilitando la toma de nutrientes y de biorreguladores, acelerando la fase de multiplicación, de crecimiento y desarrollo del material vegetal a propagar (Martínez et al., 2019). Sin embargo, la inmersión continua de los tejidos provoca estrés oxidativo debido a los bajos niveles de oxígeno, hiperhidratación o vitrificación, además de desórdenes morfológico y fisiológico de los tejidos. Para hacer frente a estos problemas se han desarrollado metodologías exitosas basadas en la inmersión temporal del material vegetal (Vilchez y Albany, 2014).

1.5 Nuevas técnicas de propagación *in vitro*

El Sistema de Inmersión Temporal (SIT) es una tecnología creada para potenciar todas las bondades de la micropropagación convencional ya que proporciona condiciones óptimas

de crecimiento y desarrollo al material vegetal micropropagado en comparación con los sistemas que utilizan medio de cultivo semisólido y medio líquido (Martínez et al., 2019; Välimäki et al., 2020). Los beneficios del SIT se deben: al uso de medio de cultivo líquido, permitir un contacto intermitente entre el explante y el medio de cultivo, facilitar el intercambio de gases al reabastecer de oxígeno y dióxido de carbono indispensables para la fotosíntesis y eliminación de gases nocivos como el etileno, mayor funcionalidad estomálica, mayor disponibilidad y absorción de nutrientes y biorreguladores (Shukla et al., 2019; Vidal y Sánchez, 2019). Por lo tanto, las plántulas producidas mediante un SIT muestran aumento de vigorosidad, ausencia de desórdenes morfológicos y fisiológicos, sistema radical apropiado y mejores índices de sobrevivencia *ex vitro* (Leyva et al., 2020).

1.5.1 Diseño y operación del SIT

Hoy en día se puede encontrar una gran variedad de sistemas de inmersión temporal difiriendo en tecnología, diseño y tamaño del contenedor, entorno que brinde al explante, automatización completa o semiautomatización (Alberto et al., 2020; Vidal y Sánchez, 2019). Los sistemas de inmersión temporal están representados por cuatro diseños diferentes (Etienne y Berthouly, 2002):

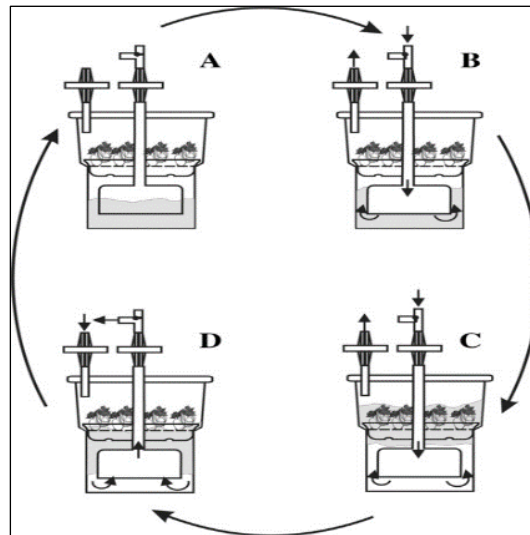
1. Sistemas con máquinas vasculares o balancines
2. Sistemas de inmersión parcial con mecanismo de renovación del medio de cultivo
3. Sistemas con inmersión completa con mecanismo de renovación del medio de cultivo
4. Sistemas de inmersión completa impulsados neumáticamente, sin renovación del medio de cultivo. Este último se estudiará a profundidad por ser objeto de estudio en esta investigación.

Dentro de los sistemas de Inmersión Completa Impulsados Neumáticamente, sin renovación del medio de cultivo existen dos prototipos principalmente; el Biorreactor de Inmersión Temporal Automatizada (RITA®) y el Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT®), pudiendo encontrar hoy en día una nueva variante comercial de este último, conocido como SETIS™ (Pérez, 2020; Martínez, y otros, 2020).

1.5.2 Funcionamiento del sistema RITA

El sistema RITA consiste en un recipiente de policarbonato dividido en dos compartimentos; un compartimento superior donde se coloca el material vegetal y el inferior sirve como tanque de almacenamiento de medio nutritivo (Alvarenga y Salazar, 2015). Tiene tapa de rosca ancha, provista con dos puertos externos, asegurado con filtros de 0,2 μm . El puerto central debe conectarse a una línea de aire que suministra el mismo al biorreactor, la sobrepresión aplicada al compartimento inferior impulsa el líquido al compartimento superior, durante un corto periodo (tiempo de inmersión), en cambio, el puerto lateral facilita la salida del aire (Figura 1-2). El baño que reciben los explantes está controlado por medio de un reloj temporizador que permite la abertura de la electroválvula que controla el sistema (Martínez, et al., 2019).

Figura 1-2: Diseño tecnológico y funcionamiento del sistema RITA



Funcionamiento operativo de un biorreactor tipo RITA: **(A)** Período de exposición; el medio de cultivo nutritivo se encuentra en el compartimento inferior y el material vegetal en el superior. **(B)** Dislocación del medio líquido; la presión de aire aplicado al compartimento inferior hace que el medio líquido se mueva hacia el compartimento superior. **(C)** Período de inmersión; el medio de cultivo baña completamente al material vegetal. **(D)** Drenaje del medio nutritivo; el flujo de aire se detiene y el medio baja al compartimento inferior debido a la gravedad (Georgiev et al., 2014).

Hoy en día se ha utilizado con éxito el sistema RITA en la micropropagación de diferentes especies vegetales, entre las que se encuentran la vainilla (*V. planifolia*) (Ramírez y

Iglesias, 2016), arándano (*Vaccinium spp.*) (Debnath, 2016), anturio (*Anthurium andreanum* L) (Alamilla et al., 2019), aliso (*Alnus glutinosa*) (San José et al., 2020) y agave (*Agave angustifolia* Haw) (Monja et al., 2021). En la Tabla 1-1 se detalla las ventajas y desventajas de este tipo de SITA.

Tabla 1-1: Características de un sistema de inmersión tipo RITA

Nombre	Ventajas	Desventajas	Creadores
-Sistema de inmersión temporal RITA	-Altas tasas de micropropagación. - Consumo eficiente de nutrientes y biorreguladores. -Operación confiable y simple. -Fácil manipulación del material vegetal.	-Elevado costo debido a las piezas importadas. -Dificultad para la renovación del medio de cultivo. -Falta de opciones para la renovación de la atmósfera. -No controla eficientemente la hiperhidratación. -Oxidación de tejidos.	-CIRAD Francia

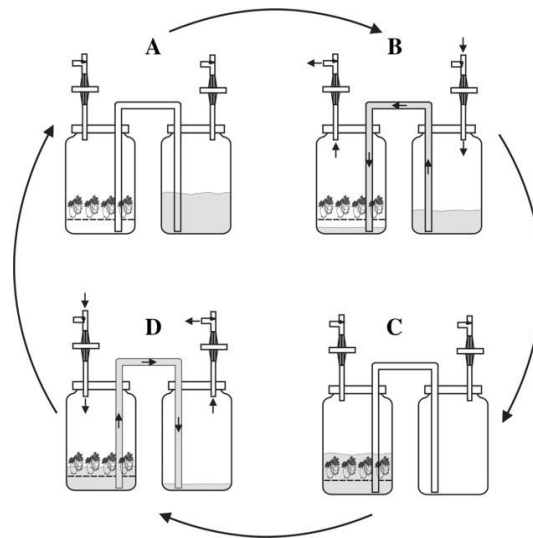
Fuente: Arredondo, 2019; Calvache y Freire, 2019

1.5.3 Funcionamiento del sistema Twin-Flask (BIT)

El sistema BIT conocido también como frascos gemelos consta de dos recipientes (biorreactores), conectados entre sí por mangueras de silicona esterilizable en autoclave. Uno de los contenedores cumple la función de cámara de cultivo mientras que el otro es utilizado como tanque de almacenamiento del medio nutritivo (Etienne y Berthouly, 2002). El recipiente de la cámara de cultivo puede o no contar con una plataforma en la parte inferior para dar soporte del material vegetal. Cada contenedor debe ir conectado a su propia línea de aire presurizado controlada por dos temporizadores independientes, acoplados con válvulas solenoides de tres vías (De Carlo et al., 2021) (Figura 1-3).

El sistema BIT tiene un diseño simple, confiable y propicio para trabajar en laboratorios. Son relativamente económicos en comparación con los costos del sistema RITA (Ramírez e Iglesias, 2016). Generalmente son fáciles de operar y su estructura puede mantener la esterilidad durante largos períodos de tiempo. Son utilizados con éxito en la micropropagación de un sin número de especies, pudiendo regenerar plántulas a partir de meristemas preformados y embriogénesis somática (Alvarenga y Salazar, 2015).

Figura 1-3: Diseño tecnológico y principio operativo del sistema Twin-Flask:



Funcionamiento operativo del SITA Twin-Flask: **(A)** Período de exposición; las líneas de aire tanto del contenedor que almacena el medio de cultivo y del material vegetal están cerradas y las válvulas solenoides abiertas a la atmósfera. **(B)** Transporte del medio nutritivo desde su contenedor hasta la cámara de cultivo, suceso que ocurre al abrir únicamente la línea de aire conectada al tanque de almacenamiento del medio, la sobrepresión transporta el líquido hacia el material vegetal. **(C)** Período de inmersión; el material vegetal es sumergido en el medio líquido, las dos líneas de aire estarán cerradas y las válvulas solenoides abiertas a la atmósfera. **(D)** Devolver el medio nutritivo a su tanque de almacenamiento, para ello, la línea de aire del contenedor que sirve como cámara de cultivo se abre, mientras que la línea de aire del tanque de almacenamiento del medio está cerrada. Nuevamente, la sobrepresión devuelve el líquido hacia el contenedor original (Georgiev et al., 2014; Marchant et al., 2021).

Varios investigadores concluyen que el diseño tan particular BIT, mejora el intercambio de gases, incrementando la capacidad fotosintética y la producción de metabolitos secundarios (Villamarín et al., 2019), lo que se traduce en mayor crecimiento y desarrollo del vegetal en un menor tiempo, mismo que se mide en biomasa total, al comparar con la técnica de micropropagación tradicional (Bello et al., 2021).

El sistema BIT se ha utilizado en varias especies vegetales, tales como; *Stevia rebaudiana* (Alvarenga y Salazar, 2015), caña de azúcar (*Saccharum* híbrido) (Martínez et al., 2020) y

malanga (*Colocasia esculenta* L) (Arano *et al.*, 2019) verificando lo mencionado. Por ello, se dice que este sistema BIT cumple la finalidad de salvaguarda la seguridad alimentaria de la humanidad al favorecer la propagación masiva y eficiente de especies de gran importancia económica o en peligro de extinción, en espacios reducidos, sin depender de las condiciones medioambientales (Arano *et al.*, 2019; Uma *et al.*, 2021). En la Tabla 1-2 se describe las características más importantes del SITA tipo BIT.

Tabla 1-2: Características de un sistema de inmersión temporal Twin-Flask (BIT)

Nombre	Ventajas	Desventajas	Creadores
-Biorreactor de inmersión temporal Twin-Flask (BIT)	-Diseño sencillo lo que hace fácil su replicación y operación. -Reduce a niveles despreciables la hiperhidricidad. -Altas tasa de multiplicación, con valores entre el 300% y 400% comparado con los métodos convencionales -Elimina los subcultivos. -Máximo aprovechamiento de nutrientes y biorreguladores. -Mayor intercambio de gases.	-Depende de dos temporizadores y la sincronización de dos válvulas electromagnéticas. -Ausencia de la opción para renovar el medio de cultivo. -Elevado costo.	-Diseñado por el Centro de Bioplantas en Cuba

Fuente: (Vilchez y Albany, 2014; Corvacho, 2019; Martínez *et al.*, 2019)

1.5.4 Generaciones de los BIT

Hoy en día existe elementos suficientes para precisar que existen al menos cuatro generaciones de BIT. En la primera el proceso era totalmente manual, en la segunda se utilizó transferencia neumática y el control se realizaba a través de un temporizador que empleaba un microprocesador, en 1997-98 se desarrolló la tercera versión, donde se emplean por primera vez autómatas comerciales sencillas, permitiendo al usuario programar, sin embargo, la parametrización era sumamente complicado, esta variante es patentada e internacionalmente reconocida (De Carlo, Tarraf, Lambardi, y Benelli, 2021). La cuarta generación del BIT cuenta ya con un sistema de Supervisión y Control que realiza tareas de control y adquisición de datos del proceso de propagación de forma sencilla y eficiente. Esta configuración del sistema de control ha alcanzado éxitos, por lo que se desea mantener, pero su principal desventaja es que el software que requiere tiene un alto costo en el mercado (Llámez, 2009).

Por ello, diseñar y construir un BIT artesanal implica una menor inversión en comparación con el capital requerido para la adquisición de cualquier prototipo comercial, debido a su alto valor adquisitivo. Así mismo, lograr la automatización mediante módulos analógicos de autómatas y software con iguales o superiores características que SmartBIT versión 1.0 será determinante para disminuir al máximo el número de operaciones manuales y lograr abaratar los costos de producción en esta primera etapa (Llámez, 2009; Martínez *et al.*, 2020).

Para la automatización de un SIT existen ya diferentes aplicaciones y mecanismos que interfieren en su control. El más confiable y ampliamente documentado es el uso de electroválvulas conectadas a un compresor, controlando a través de un temporizador programable para determinar frecuencia y tiempo de inmersión (Arredondo *et al.*, 2019). Cabe mencionar que la programación y el manejo de los dispositivos que componen el SIT requiere de la supervisión constante por parte del personal para verificar que el sistema está marchando con normalidad. Mediante el uso de controladores Lógicos Programables (PLC por sus siglas en inglés) se puede controlar y monitorear a distancia el sistema a través de internet. Sin embargo, debe ser programado con un software especializado (Espinosa, Arellano y Diego, 2017).

Existen experiencias exitosas en otros países en la construcción de prototipos BIT. Sólorzano (2016) de la Universidad Nacional de Trujillo, Perú, construyó un prototipo semiautomatizado para la multiplicación de *Ananas comosus* empleando frascos plásticos, un compresor de aire controlado por electroválvulas y un temporizador. En México, Arredondo (2009) diseñó y automatizó con éxito un BIT, al igual que Vives *et al.*, (2017) y Villamarín *et al.*, (2019), quienes lograron incrementar la producción de glucósidos de esteviol en plantas de *Stevia rebaudiana* micropropagadas en este sistema. En Ecuador, la Universidad de las Américas y la Unidad de Investigación Tecnológica (UITEC) en 2019 construyeron y semiautomatizaron un BIT para la multiplicación de diversas especies agrícolas (Calvache y Freire, 2019).

2.Objetivos

2.1 Objetivo general

Establecer un protocolo *in vitro* para la multiplicación masiva de palma iraca (*Carludovica palmata* Ruiz & Pav) bajo un sistema de inmersión temporal automatizado Twin-Flask (BIT).

2.1.1 Objetivos específicos

- Diseñar, instalar y poner en marcha un SITA tipo “BIT” para la multiplicación masal de plántulas de *C. palmata*.
- Determinar los parámetros técnicos del SITA para el cultivo de *C. palmata* (volumen, tiempo y frecuencia).
- Evaluar densidad de explantes por biorreactor.

3. Materiales y Métodos

3.1 Materiales

En la Tabla 3-1 se presenta los materiales y equipos utilizados en la construcción del SITA con sus respectivas especificaciones.

Tabla 3-1: Materiales y equipos del sistema de inmersión automatizado

Dispositivo	Cantidad	Observaciones
Compresor de aire Schulz MS 3/30	1 Und	Presión máxima 120 lbf/pol2 29 litros en tanque de almacenamiento, 110 V - 8,6 A.
Electroválvula solenoide UNID UD 8	6 Und	Voltaje de alimentación: 120 V compatible con tubería de 1/4".
Control		
Caja metálica externa	1 Und	Almacena el sistema de control y las protecciones eléctricas.
Temporizador Digital DIGImec BNDS-X2	1 Und	Programación del tiempo por día o para toda la semana. Selección del tiempo de activación y apagado con horas y minutos.
LOGO! 12/24 RC	1 Und	8 entradas digitales 4 salidas análogas 24 V DC de alimentación 230 V AC máximo de salida.
LOGO! 230 RC	1 Und	8 entradas digitales 4 salidas análogas 115 V de alimentación 230 V AC máximo de salida.
Interruptor Selector	6 Und	2 posiciones de uso (ON/OFF) Corriente de máxima 10A
Interruptor de paro de emergencia	1 Und	Interruptor 2 posiciones de uso (ON/OFF).
Iluminación		
Cable Dúplex 2X14	45 m	Capacidad máxima de voltaje 330V
Lámparas LED 2x18W	6 Und	Luminaria con base de tubo de vidrio
Protecciones		
Interruptor C60N Scheinder Electric	1 Und	Protección contra sobre corriente eléctrica
Interruptor VCP Q1 C6	1 Und	Protección contra sobre corriente eléctrica
Relé térmico de 11 pines Relpol	1 Und	Voltaje de operación 110 V
Relé contacto en estado sólido	1 Und	Voltaje máximo de operación 480V Corriente máxima de operación 25A
Tubería		
Válvula Bola de bronce Chapola 1/4"	6 Und	Válvula mariposa para dividir pisos del SIT
Niple Galvanizado 1/4" por 8 cm	6 Und	Tubería del SIT
Niple Galvanizado 1/4" por 12 cm	24 Und	Tubería del SIT
Niple Galvanizado 1/4" por 25 cm	108 Und	Tubería del SIT
Niple Galvanizado 1/4" por 50 cm	2 Und	Tubería del SIT
Cruz inoxidable tipo 304 1/4"	2 Und	Tubería del SIT
Codo valnizado 1/4"	12 Und	Tubería del SIT
Tee galvanizada 1/4"	96 Und	Tubería del SIT
Racor B3 Macho 1/4" X 1/4"	306 Und	Conexión a la manguera de la tubería
Biorreactores		
Manguera siliconada 1/4" 3/8"	37,6 m	-
Manguera siliconada 3/16" 3/8"	3 m	-
Manguera de poliuretano 3/8" azul	22,8 m	-
Filtro hidrofóbico MidiSart 2000	102 Und	-
Vaso redondo 1000CC vidrio R:63	102 Und	Vasos para el cultivo

3.1.1 Reactivos

En la Tabla 3-2 se muestra los reactivos utilizados en la fase de multiplicación de *C. palmata*.

Tabla 3-2: Reactivos utilizados en la preparación del medio de cultivo, para la propagación masiva de *C. palmata*

Reactivos	Concentración	Casa comercial
6-Benzilaminopurina	95 %	Sigma-Aldrich
Ácido 1-naftalenacetico	95 %	Sigma-Aldrich
Sacarosa		Sigma-Aldrich
phytagel		Sigma-Aldrich
Medio basal Murashige and Skoog (MS)	Completo	Sigma-Aldrich
Agua destilada		

3.2 Metodología

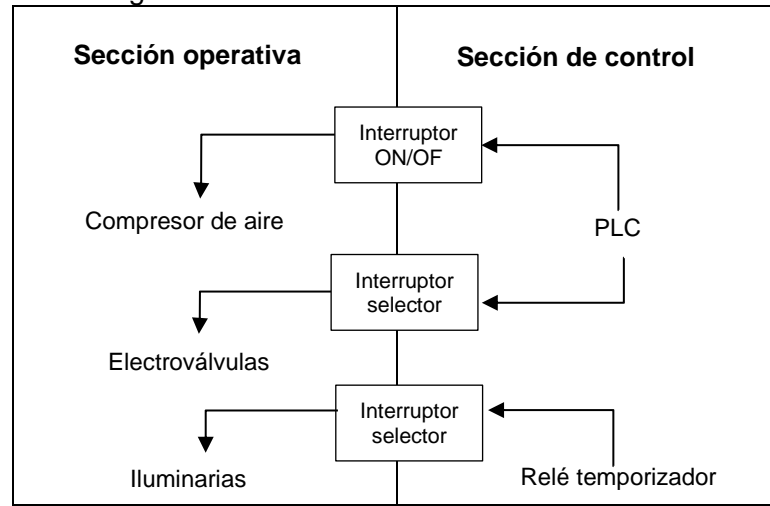
- El proceso experimental incluye dos etapas: La primera, diseñar, instalar y poner en marcha un SITA tipo "BIT" en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. La segunda, determinar los parámetros técnicos del SITA para el cultivo de *C. palmata* (volumen, tiempo, frecuencia y densidad de explantes). Aquí, se realizó un experimento utilizando un diseño experimental, conocido como parcelas subdivididas. Evaluando frecuencia de inmersión en parcela grande (estante completo), tiempo de inmersión en subparcelas (en cada piso del estante) y número de explantes y volumen de medio en sub, subparcelas (a nivel de biorreactor).

3.2.1 Construcción del SITA Twin-Flask (BIT)

Se construyó un SITA de modelo lógico Smart BIT versión 2.0 compuesto por una sección operativa y otra de control, mismos que se describen a continuación:

- Operativa**, que se compone de electroválvulas, compresor de aire y luminarias que permiten la dinámica del sistema.
- Control**, integrado por un relé digital, dos PLC y el portal de acceso web (Smart BIT 2.0.) estos fueron los encargados de accionar los dispositivos de la sección operativa (Figura 3-1).

Figura 3-1: Modelo lógico del SITA

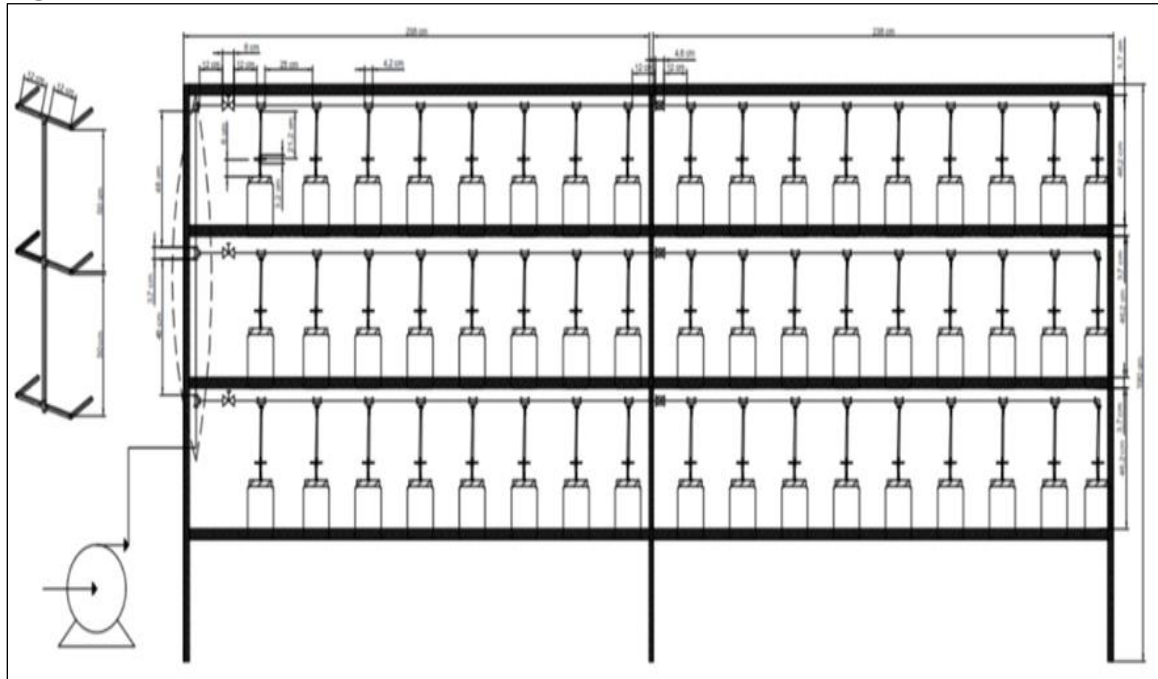


Fuente: Miranda y Flores, 2020

▪ **Estructura física**

Los biorreactores se montaron en dos estantes metálicos de 235 cm de largo por 190 cm de alto y 53 cm de ancho, compuesto de tres pisos cada uno de 46,3 cm de alto. Cada estante corresponde a una sección de trabajo parcialmente independiente. En la sección uno, se instaló la tubería vertical y las electroválvulas del SITA siendo la primera parte en recibir el aire entregado por el compresor. La sección dos, se encuentra alejado de las electroválvulas y tiene la opción de detener su funcionamiento a través llaves que impiden el flujo de aire suministrado por el compresor, además, el encendido y apagado de la iluminación de manera independiente (Figura 3-2).

Figura 3-2: Estructura física del SITA desarrollado

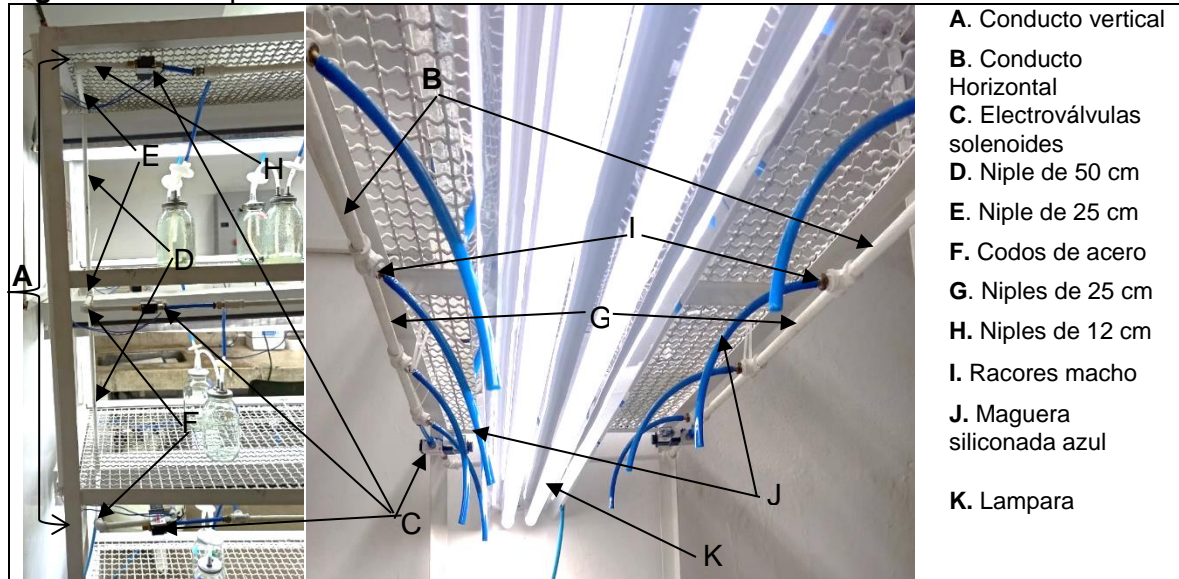


Fuente: Miranda & Flores, 2020

▪ Tubería

La estructura de la tubería recorre el largo total de las dos secciones, un conducto en vertical se colocó en los dos pisos del primer estante y se encuentra conformado por ocho niples galvanizados (1/4"), dos de 50 cm y seis de 25 cm, un acople en cruz inoxidable (tipo 304 1/4" 150 psi), dos tees galvanizadas (1/4") y codos de acero en sus esquinas para poder integrarse a la tubería horizontal instalada en cada piso. En la parte horizontal se colocó niples de 12 cm para ejecutar la conexión de las electroválvulas y las válvulas bola de bronce (de manipulación manual). Niples de 25 cm fueron utilizados para unirse a las tee galvanizadas por medio de racores macho de 1/4" y manguera siliconada transportan el aire hacia cada biorreactor del SITA. En las figuras 3-3 se puede observar la tubería del sistema de inmersión desarrollado.

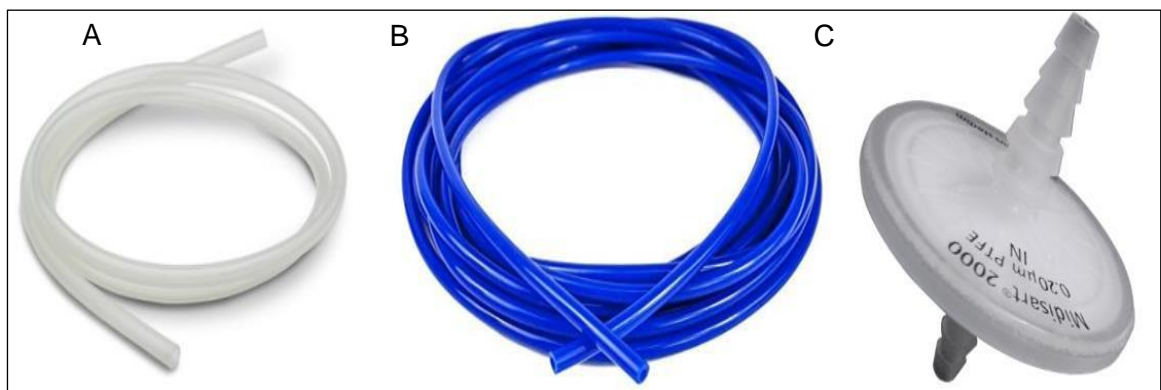
Figura 3-3: Implementación de la tubería del SITA



▪ Mangueras y Biorreactores

La conexión entre la tubería y los biorreactores se ejecutó por medio de manguera de poliuretano de 3/8" (azul) debido a su alta resistencia al suministro de aire a gran presión, estas mangueras transportan el aire suministrado por el compresor desde la tee galvanizada hacia los filtros con membrana de politetrafluoretileno (PTFE) en el cual se purifica el aire que ingresa a los biorreactores (Figura 3-4). Para la conexión entre el filtro y el biorreactor se utilizó manguera siliconada transparente debido a que tiene mayor flexibilidad de conexión con diferentes objetos.

Figura 3-4: Mangueras utilizadas para conectar la tubería con los biorreactores

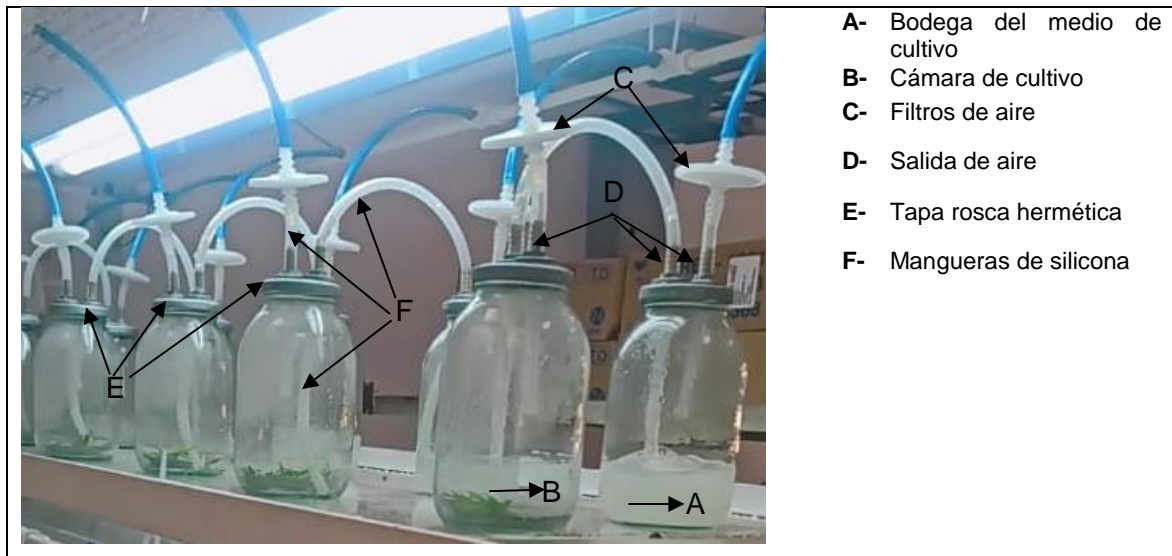


A: Manguera siliconada, **B:** Manguera de poliuretano, **C:** Filtros de aire Midisart utilizados por el subsistema suministro de aire

▪ Biorreactores

Para la construcción de los biorreactores se utilizaron botellas de vidrio de igual volumen (1.000 mL) con altura máxima de 17,8 cm y de tapa rosca hermética, a las que se le acopló dos racores para entrada y salida de aire de un cuarto de pulgada ($\frac{1}{4}$ "). Así, un biorreactor quedó integrado por dos recipientes unidos entre sí mediante mangueras de silicona que se conecta a los racores de las tapas. Una de las botella funciona como cámara de cultivo con el material vegetal a propagar y la segunda almacena el medio de cultivo líquido. Uno de los racores está conectado mediante un filtro a la línea de aire que genera el compresor. En la Figura 3-5 se puede observar la implementación realizada de los biorreactores del sistema.

Figura 3-5: Biorreactores de inmersión temporal automatizado Twin-Flask



▪ Software

Los programas de funcionamiento del SITA fueron desarrollados utilizando la plataforma Logo SoftComfort de los dos Controladores Lógicos Programables (PLC, por sus siglas en inglés) de la serie LOGO de SIEMENS, versión 8.3 (Figura 3-6). El programa fue descargado a los PLC mediante la configuración de red punto a punto con el computador anotando la dirección IP 192.168.0.78 y 192.168.0.77 respectivamente.

Figura 3-6: Controladores Lógicos Programables (PLCs) del SITA

Controladores Lógicos Programables Versión 8.3 con WebServer incorporado. **A:** LOGO! 12/24RCE de alimentación 24VDC y **B:** LOGO! 230RCE de alimentación 110-240 VAC

- Automatización

Conjuntamente se desarrolló un portal de acceso web donde se realizó la programación del SITA. Esta aplicación permite monitorear en tiempo real su funcionamiento, desde cualquier teléfono inteligente o computador dentro de la universidad. El programa de la página web fue creado y diseñado utilizando la plataforma gratuita Logo Web Editor (LWE, por sus siglas en inglés) Versión 1.1.0 liberado en el año 2020 e instalado en el PLC utilizando una conexión punto a punto con el ordenador. La dirección IP para la conexión fue 192.168.0.78.

3.2.2 Descripción del SITA

El SITA está compuesto por tres subsistemas:

- Subsistema de inyección de aire

Encargado de almacenar y transportar aire a presión hacia los diferentes biorreactores, se compone del compresor de aire, electroválvulas, tubería, mangueras, filtros y frascos de vidrio para suministrar los nutrientes al material vegetal.

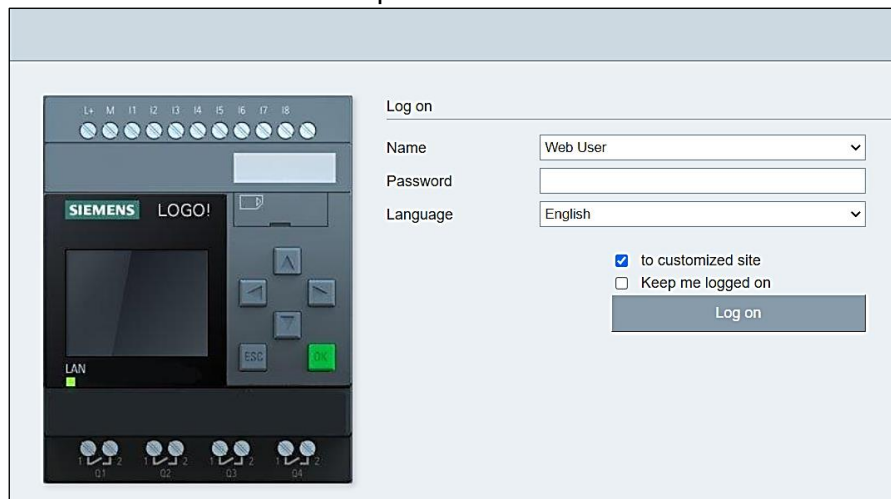
▪ Subsistema de control

Permite el funcionamiento del SITA, está formado por dos programas desarrollados para este fin (software) y la página web “Smart BIT 2.0.” Los pasos para poner en marcha este subsistema es:

-Acceder a la aplicación Smart BIT 3.0 anotando la dirección IP 192.168.0.78. desde cualquier navegador web.

- Ingresar usuario y contraseña (Figura 3-8).

Figura 3-7: Control de acceso a la aplicación Smart BIT 3.0.



Fuente: Portal de acceso web de SIEMENS

-En la interfaz de la aplicación Smart BIT 3.0 se ajusta las variables de operativización del SITA (Figura 3-9). La secuencia para realizar dichos ajustes es la siguiente:

- 1.-Tiempo de carga del compresor. Introducir un valor de tiempo en minutos, para el almacenaje del aire.
- 2.-Contador de aperturas. Colocar el número de veces que las electroválvulas se activarán, antes de que el compresor renueve su recarga.
- 3.-Apertura de electroválvulas. Introducir el tiempo de actividad de cada electroválvula. De acuerdo con lo investigado 10 segundos de activación de las electroválvulas L1, L2 y L3 es suficiente para transportar el medio de cultivo hacia el biorreactor que contiene el material vegetal y 12 segundos de activación de las electroválvulas V1, V2 y V3 para devolver el medio de cultivo hacia el frasco de origen.

4.-Tiempo de inmersión. Introducir el tiempo que el material vegetal estará en contacto con el medio líquido. Este parámetro se coloca en minutos.

5.-Frecuencia de inmersión. Ingresar el tiempo que debe transcurrir antes de que ocurra un nuevo ciclo de inmersión, esta se registra en minutos.

6.-Cargar compresor (SI/NO). Definir sí el compresor va a renovar su carga de forma manual (NO) o automática (SI). Al accionar el botón “SI” saldrá un aviso en la parte inferior “cargando compresor” lo que indica que cada vez que se cumpla el número de aperturas de las electroválvulas, el compresor iniciará su carga.

7.-Botones selectores Fila 1, Fila 2 y Fila 3. Estos selectores conectan la sección operativa con la de control. Cada piso del SITA está controlado por un botón selector (piso 1/Fila 1). Una vez introducido los valores en el tablero de ajustes, se debe presionar el botón selector correspondiente al piso que desea activar, observando un cambio de rojo (OFF) a verde (ON), indicando que el piso fue activado.

8.-Botón de arranque ON/OFF. Una vez realizado todos los pasos anteriores se debe presionar el botón de arranque para poner en marcha el SITA, observando un cambio de iluminación rojo (OFF) a verde (ON), lo que significa que el sistema inició su funcionamiento. Para desactivar el sistema en su totalidad también se utiliza este botón.

La operación de esta interfaz permite el monitoreo en tiempo real del correcto funcionamiento del sistema mediante un teléfono inteligente o computador dentro del campus de la Universidad.

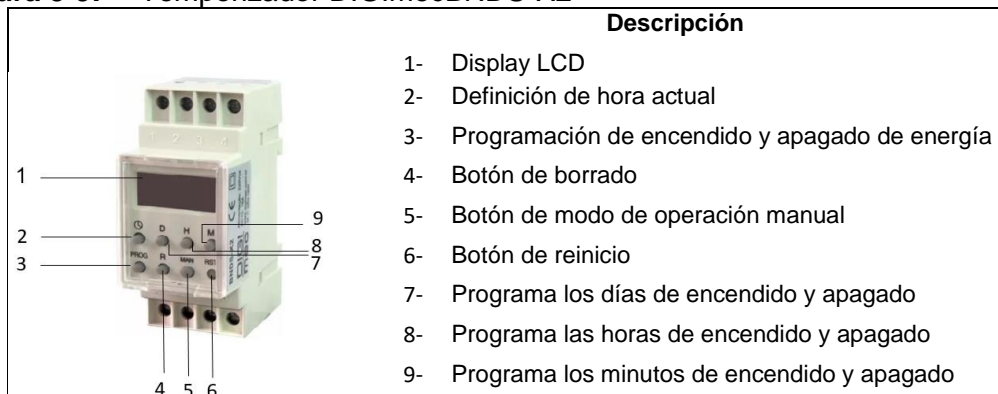
Figura 3-8: Interfaz amigable del SITA tipo BIT 3.0. construido



▪ Subsistema de iluminación

Encargado de proporcionar fotoperiodo al material vegetal micropropagado. Este subsistema utiliza, lámparas LED 2x18W y un temporizador digital de riel DIGImec, donde se programó el tiempo de activación y apagado de las luminarias del SITA (Figura 3-10). Posee batería propia, por lo que su funcionamiento es independiente de los subsistemas de inyección y control de aire.

Figura 3-9: Temporizador DIGImecBNDX-2



3.3 Metodología para la micropropagación de *C. palmata* utilizando el SITA

La presente investigación se desarrolló en los Laboratorios de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Colombia en Medellín. Las condiciones ambientales del laboratorio donde se realizaron los experimentos fueron una temperatura constante de 23°C +/- 2°C, una luminosidad de aproximadamente 1500 lux, una radiación fotosintéticamente activa de 90 μmol de fotones $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ y fotoperiodo de 12/12 h de luz y oscuridad.

3.3.1 Obtención del material vegetal

Como material de partida se utilizaron algunos clones de plántulas de *C. palmata* regenerados *in vitro* en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Nacional de Colombia en Medellín. Tenían entre 5 y 7 meses de edad, con una altura promedio de 8 cm y un diámetro de tallo de al menos 0,5 cm.

3.3.2 Preparación del explante

Dentro de la cámara de flujo laminar se procedió a eliminar el sistema radical y la vaina verticilada de las hojas de las plántulas de *C. palmata*, dejando el tallo completamente desnudo con el meristemo apical protegido con una sola hoja envolvente. El explante utilizado en cada una de las técnicas de multiplicación *in vitro* (SITA, líquido y semisólido) midió 2 cm de longitud y un diámetro de tallo de 0,5 cm aproximadamente (Figura 3-10).

Figura 3-10: Explantes utilizados en el experimento



3.3.3 Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado estuvo compuesto por MS completo, suplementado con 1 mg L⁻¹ de 6-Benzilaminopurina (BAP), 0, 5 mg L⁻¹ de Ácido 1-naftalenacético (ANA) y 20 g L⁻¹ de sacarosa. Además, se adicionó 4 g L⁻¹ de phytigel en la preparación del medio semisólido.

3.3.4 Desarrollo del experimento

Para la fase de experimentación en el SITA, se procedió a transferir diferentes volúmenes de medio de cultivo líquido (50, 100 y 200 mL) a cada par de botellas que conformaron un biorreactor, de tal forma, que seis biorreactores contengan cada uno de los volúmenes de medio antes descrito y se procedió a esterilizar en autoclave (Trident, Taiwán) a 15 psi, 121°C por 15 min.

En condiciones de asepsia total, dentro de una cámara de flujo laminar se colocaron cinco o diez explantes en la segunda botella del biorreactor. De tal manera, que tres biorreactores que contengan un mismo volumen de medio quedaran con 5 explantes y los otros tres restantes con 10 explantes en su segunda botella. Seguidamente; los seis biorreactores fueron instalados en cada uno de los pisos del SITA.

Finalmente, se realizó la programación del SITA mediante la página web de los PLCs Siemens LOGO! configurando los parámetros como; frecuencia de inmersión (6 y 12 h), accionamiento general del sistema. Tiempos de inmersión (1, 3 y 5 min), periodo en el cual los explantes fueron sumergidos en medio de cultivo líquido (pisos del SITA).

En el caso de las otras dos técnicas (semisólido y líquido), se sirvió 20 mL de medio de cultivo por frasco de vidrio (envase FLINT 245 CC B. 53, terminado rosca) y autoclavado a 15 psi, 121°C por 15 min. Cinco explantes fueron colocados en cada uno de los frascos, se cerró herméticamente y se colocó junto a los biorreactores del SITA.

3.3.5 Factores en estudio

Los factores evaluados fueron: tres volúmenes de medio de cultivo, dos densidades de explantes por biorreactor, tres tiempos de inmersión y dos frecuencias de inmersión, tal como se describe en la Tabla 3-3.

Tabla 3-3: Factores en estudio

Factores	Cantidad
Volumen de medio	50 mL
	100 mL
	200 mL
Densidad de explantes por biorreactor	5
	10
Tiempo de inmersión	1 min
	3 min
	5 min
Frecuencia de inmersión	6 h
	12 h

3.3.6 Las variables de respuesta fueron

- Número de brotes por explante
- Longitud de brotes
- Número de raíces
- Longitud de raíces
- Número de Hojas
- Peso seco del cultivo

3.3.7 Diseño experimental

Los factores se asignaron a las unidades experimentales sobre la base de un diseño de parcelas divididas: la frecuencia de inmersión se asignó a las parcelas completas (acción completa del TIB) sobre la base de un diseño completamente aleatorio con dos repeticiones. El tiempo de inmersión se asignó a las parcelas divididas (estantes), cada una conformada por seis biorreactores. El número de explantes y el volumen del medio de cultivo se asignaron a las split-plots, es decir, a los biorreactores conformados por botellas de 1L de capacidad con explantes de *C. palmata*. La unidad experimental consistió en una botella con capacidad de 1 L con explantes de *C. palmata* sumergido en un volumen particular de medio de cultivo por distintos tiempos y frecuencias de inmersión.

Se eligieron los dos mejores tratamientos del sistema TIB para compararlos con los sistemas de medio semisólido y medio líquido con inmersión parcial. Dado que ni el medio semisólido ni el líquido permiten controlar los factores asociados a la inmersión (frecuencia

y tiempo), la comparación se realizó mediante un diseño de bloques al azar generalizado, bloqueando en función del tiempo de ejecución.

3.3.8 Análisis estadístico

Todos los datos se analizaron con el software estadístico R, V. 4.1.3 (R Core Team, 2022). Para los datos experimentales de TIB se ajustó un modelo de parcela dividida con la función `lmer{lmerTest}`. La normalidad de los residuos se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk (`shapiro.test{stats}`). Las diferencias entre tratamientos se evaluaron mediante la prueba LSD con corrección de Holm para la multiplicidad dentro de cada familia (`diffLsmeans{lmerTest}`). Todas las pruebas se evaluaron a un nivel de significación de 0,05.

Se ajustó un modelo de bloques aleatorios generalizados (`aov{stats}`) para comparar los tres métodos de micropropagación *in vitro*. Las diferencias entre los tratamientos se evaluaron con un nivel de significación de 0,05. La distribución normal y la homogeneidad se comprobaron con las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Las comparaciones por pares se realizaron mediante la prueba HSD Tukey.

Dado que todos los factores evaluados eran numéricos, se ajustó un modelo completo de superficie de respuesta de segundo orden a cada una de las variables dependientes utilizando Statgraphics Centurion, versión XVI. También se utilizó este software para generar los niveles de las combinaciones de factores que se espera optimizaran el conjunto de variables de respuesta evaluadas en la micropropagación de *C. palmata*.

4. Resultados y discusión

4.1 Número de brotes por explante

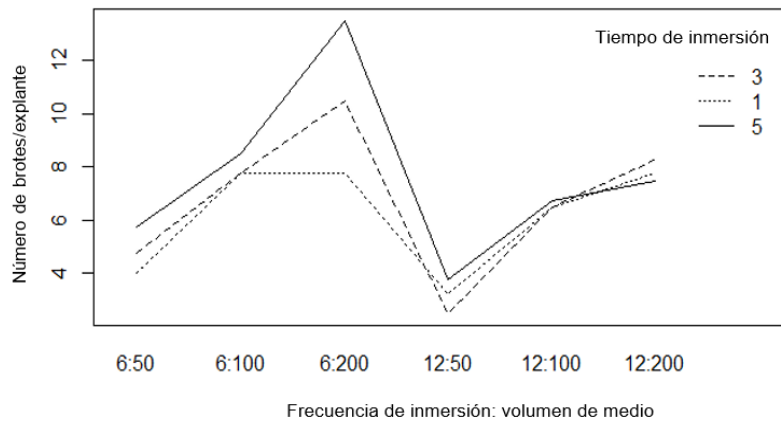
El análisis de varianza (ANOVA) (Anexo A) mostró diferencias significativas para las interacciones de segundo orden, por lo que se analizó efectos simples de cada uno de los factores en estudio. La investigación científica entorno a la micropropagación *in vitro* de *C. palmata* es extremadamente limitada, por tanto, la discusión se realiza con los resultados obtenidos en otras especies.

4.1.1 Tiempo de inmersión para número de brotes

El tiempo de inmersión no difirió estadísticamente en el número de brotes por explante al ser evaluado con frecuencia de 12 h, evidenciando una regeneración muy similar. En cambio, con una frecuencia de 6 h, si evidenció diferencias significativas, la condición que mayor número de brotes generó fue, un tiempo de inmersión de 5 min con 200 mL de medio de cultivo, con un promedio de 11,32 brotes por explante, esto al comparar con inmersión de 1 min, que evidenció los menores promedios en cada volumen de medio evaluado (Figura 4-1). Estos resultados coinciden con la literatura científica, aunque en otras especies. Rachmi et al., (2019) indican que el número de brotes por explante es proporcional al tiempo de inmersión, es decir, mayor tiempo de inmersión mayor número de brotes. Resultados similares presentan Alvarenga y Salazar (2015) en *Stevia rebaudiana*, donde un tiempo de inmersión prolongado (10 min) incrementa la tasa de proliferación de brotes en comparación con un tiempo de inmersión corto (5 min) utilizando un sistema BIT.

En contraste con nuestros resultados, The et al., (2019) al evaluar los tiempos de inmersión 30, 60, 90, 120 y 150 s; frecuencia de inmersión 8 h, encontraron que los tiempos de inmersión largos (90 s) incrementan la proliferación de brotes, sin embargo, a medida que el periodo de exposición aumenta a 120 o 150 s la tasa de multiplicación disminuye y se observa una excesiva acumulación de agua en los tejidos de clavel (*Dianthus caryophyllus*). Por el contrario, según nuestros registros no se observó plántulas con hiperhidricidad al trabajar con inmersión de 5 min.

Figura 4-1: Interacción de segundo orden: frecuencia, tiempo de inmersión y volumen de medio de medio por biorreactor, para la variable de respuesta número de brotes



4.1.2 Frecuencia de Inmersión para el número de brotes por explante

El análisis de los resultados mostró que la frecuencia de inmersión tiene una tendencia opuesta al tiempo de inmersión ya que una frecuencia de 6 h fue la condición más deseable para generar un mayor número de brotes por explante (Figura 4-1 y 4-2). Esta frecuencia de inmersión ha sido favorable en diversas especies como: clavel (*D. caryophyllus*) (Ahmadian et al., 2017), banana (Rasthali AAB—Silk) (Uma et al., 2021) y *Plumeria rubra* L (Airò et al., 2017).

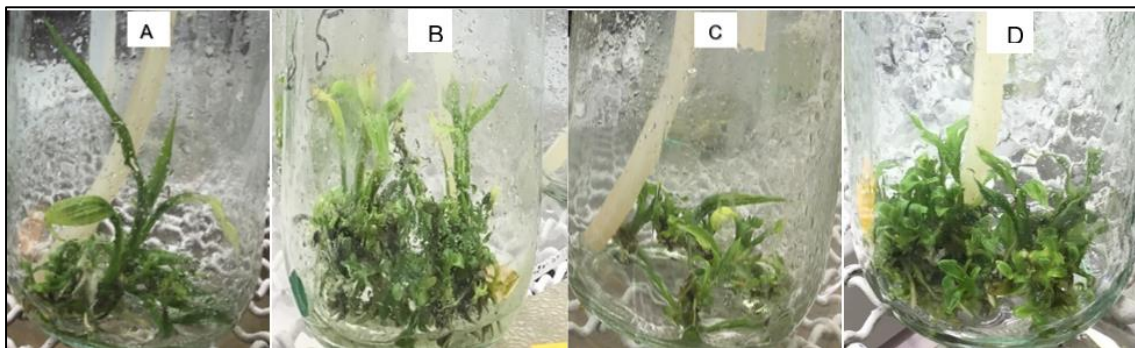
Varios autores señalan que frecuencias de inmersión cortas incrementan las tasas de multiplicación, pero también favorecen a la hiperhidricidad de tejidos (Pramita et al., 2018). Esta condición se ha observado en varias especies como: el clavel (*D. caryophyllus*) (The et al., 2019; Ahmadian et al., 2017), en la pera (*Pyrus communis*) (Lotfi et al., 2020) y en *P. rubra* (Airò et al., 2017). La hiperhidratación es un trastorno fisiológico que implica la acumulación de agua apoplástica y conduce a la apariencia vidriosa de los tejidos debido a la larga interacción de los explantes y el medio líquido (Bello et al., 2021).

Existen especies que responden eficientemente a frecuencias de inmersión bajas, consiguiendo altas tasas de multiplicación sin presentar hiperhidricidad, tal es el caso de la pitahaya (*Hylocereus undatus*) (Bello et al., 2021) y la orquídea (*Guarianthe skinneri*) (Leyva et al., 2020). Por el contrario, en *Stevia rebaudiana* (Ramírez y Iglesias, 2016) y arrayán (*Myrtus communis*) (Aka et al., 2020) muestran una mayor tasa de micropropagación con frecuencias de inmersión altas.

De acuerdo con nuestro estudio, Uma et al., (2021) señalan que la frecuencia de inmersión de 12 h disminuye el número de brotes por explante en banano. De igual manera Arano et al., (2020) indican que las frecuencias de inmersión largas (8 y 12 h) reducen la tasa de proliferación de brotes de *Colocasia esculenta*. Por otro lado, existen especies como la vainilla (*Vanilla planifolia*) (Ramos et al., 2014) y anturio (*A. andreaum*) (Martínez et al., 2019) que responden adecuadamente a un amplio rango de frecuencias de inmersión (4, 8 y 12 h), no reportando diferencias estadísticas significativas entre frecuencias largas o cortas para la variable número de brotes.

Lo expuesto anteriormente indica que la frecuencia de inmersión óptima varía considerablemente de acuerdo con la especie, proceso de micropropagación y tipo de SITA utilizado (Etienne y Berthouly, 2002). Por ello, es importante determinar la mejor frecuencia de inmersión para cada especie durante el proceso de micropropagación, ya que una frecuencia inadecuada podría tener efectos negativos en el desarrollo de los explantes.

Figura 4-2: Efecto de la frecuencia de inmersión y el volumen del medio de cultivo en la generación de brotes de *C. palmata*



Biorreactores de inmersión temporal con 10 explantes de *C. palmata* y sometidos a inmersión de 5 min. **A:** con 50 mL de medio de cultivo por biorreactor y frecuencia de inmersión 6 h. **B:** con 200 mL de medio de cultivo por biorreactor y frecuencia 6 h. **C:** con 50 mL de medio de cultivo por biorreactor e intervalo de inmersión de 12 h. **D:** con 200 mL de medio de cultivo por biorreactor e intervalo de 12 h. A los 60 días de cultivo.

4.1.3 Volumen del medio de cultivo para número de brotes por explante

Nuestros resultados revelaron que añadir 200 mL de medio de cultivo (de 20 o 40 mL/explante) incrementó el número de brotes por explante, en las dos frecuencias de inmersión evaluadas. La condición más apropiada para incrementar el número de brotes

por explante fue 200 mL de medio de cultivo/biorreactor, con 5 explantes y frecuencia de 6 h, con un promedio máximo de 9,40 brotes. Además, se observó que 50 mL de medio de cultivo por biorreactor (5 y 10 mL/explante) fue el menos adecuado en cada uno de los tiempos y frecuencias de inmersión (Figura 3-3 y 3-4).

Resultados similares son reportados por Ramos et al., (2014) en vainilla (*V. planifolia*) quienes indican que un volumen de 25 mL/explante de medio de cultivo es el tratamiento más adecuado para la formación de nuevos brotes. De igual manera, Uma et al., (2021) en banano (Rasthali AAB—Silk) encontraron que un volumen de 40 mL de medio de cultivo por explante mejora la tasa de multiplicación en comparación con 16 y 83 mL. Esta misma tendencia muestra Arano et al., (2020) en *C. esculenta* donde 25 o 50 mL/explante favorece al incrementar el número de brotes, mientras que, un volumen de 12,5 y 100 mL provoca una disminución de la tasa de proliferación.

Una posible explicación a estos reportes podría ser que en el técnica de CTV *in vitro*, los explantes absorben nutrientes únicamente por el tejido que interactúa con el medio de cultivo (Etienne y Berthouly, 2002). Siendo así, el SITA al usar medio de cultivo liquido intermitente, permite que toda la epidermis del material vegetal se cubre con una película de medio en cada frecuencia de inmersión, lo que se traduce a una mayor área de absorción y disponibilidad de nutrientes y biorreguladores (Ramos et al., 2014). En este sentido, al usar un volumen de medio de cultivo escaso, solo una parte de los explantes interactúe con el medio nutritivo dificultando la toma de nutrientes, además, de un rápido agotamiento de nutrientes y la molécula energética (sacarosa) dando como resultado tasas de multiplicación ineficientes, afectando el crecimiento y desarrollo del vegetal micropropagado, además de exponer al material vegetal a niveles crecientes de estrés.

Así también, se ha observado que usar volúmenes de medio de cultivo altos afectan negativamente la tasa de multiplicación. Debido probablemente a que el material vegetal excreta algunos compuestos químicos extracelulares estimulantes, mismos que se diluyen cuando se utiliza grandes volúmenes, lo que ocasiona una disminución en la tasa de multiplicación (Arano et al., 2020).

Figura 4-3: Efecto del Volumen de medio en la micropropagación de *C. palmata* mediante un BIT



Brotos de *C. palmata* generados en un SITA con un tiempo de inmersión de 3 min, 5 explantes y frecuencia de inmersión de 6 h. A los 60 días de cultivo. **A:** con 20 mL de medio de cultivo por explante, **B:** con 5 mL de medio de cultivo por explante.

4.1.4 Densidad de explantes para número de brotes por explante

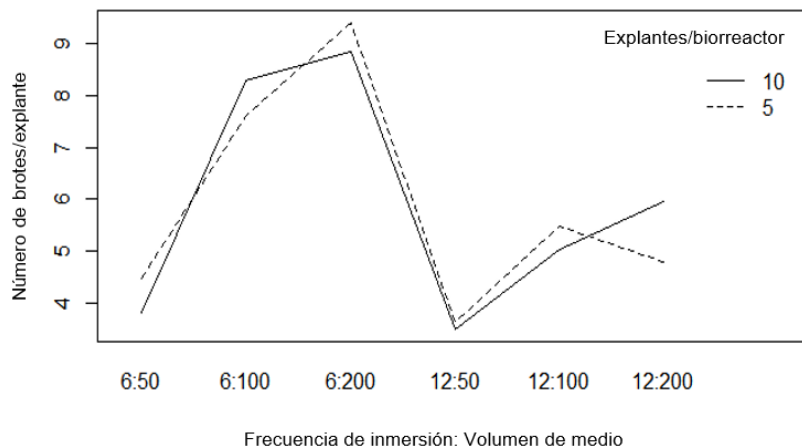
La densidad de explantes/biorreactor no mostraron diferencias significativas al ser estimado en cada volumen de medio de cultivo y frecuencia de inmersión, existiendo una única excepción (200 mL de medio de cultivo y Frecuencia 12 h) donde se evidenció que una densidad de inóculo inicial de 10 explantes mejoró mínimamente la producción de brotes (5,96), al comparar con un inóculo de 5 unidades (4,80) (Figura 4-4). Aunque en algunos casos, la densidad del inóculo inicial no es decisivo en términos biológicos, sí es en términos prácticos ya que permite optimizar al máximo los recursos y volviéndolo sumamente rentable desde el punto de vista económico.

Bello et al., (2021) enseñan que la densidad de explantes por biorreactor es uno de los factores más importantes que necesita ser estandarizado para cada uno de los cultivos, ya que este permite controlar aspectos morfológicos y fisiológicos del material vegetal durante su crecimiento y desarrollo *in vitro*. Así, Marchant et al., (2021) indican que la tasa de multiplicación fue proporcional al número de explantes por biorreactor, demostrando que

la densidad del inóculo inicial por biorreactor, el volumen del medio por matraz y la fuente de luz afectan la propagación *in vitro* de cúrcuma (*C. longa*). De igual manera, Uma et al., (2021) indican que una densidad de 6 explantes/biorreactor es la condición óptima para el cultivo de banano (Rasthali AAB—Silk) micropropagado mediante un sistema BIT.

Bello et al., (2021) al evaluar 5,10,15 y 20 explantes/biorreactor de 1 L de capacidad, en la multiplicación de pitahaya (*H. undatus*), sugiriendo utilizar una densidad entre 10 y 15 explantes/biorreactor con 50 y 33,3 mL de medio de cultivo/explante, para reducir los costos de producción, sin afectar la tasa de multiplicación y el desarrollo de los brotes. Por otro lado, Polzin et al., (2014) evaluaron las mismas densidades de inóculo inicial anteriormente descritas y mencionan que la densidad de explantes no afecta la tasa de multiplicación del ñame africano (*Dioscorea cayenensis*), resultados similar a lo obtenido en nuestra investigación.

Figura 4-4: Interacción de segundo orden: Frecuencia de inmersión, número de explantes por biorreactor y volumen de medio por biorreactor, para la variable de respuesta número de brotes



4.2 Variable de respuesta longitud del brote

El análisis de varianza (ANOVA) mostró diferencia significativa para las interacciones de segundo orden, por lo que se analizó efectos simples de cada uno de los factores en estudio (Anexo B).

4.2.1 Tiempo de inmersión para longitud del brote

El tiempo de inmersión jugó un papel importante en el crecimiento de nuevos brotes. Un tiempo de inmersión 1 y 3 min mostraron ser los niveles más prometedores para aumentar la longitud de los brotes, evidenciando promedios de 1,56 y 1,49 cm bajo una frecuencia de 6 h y las mayores longitud 2,21 y 2,44 cm se consiguieron con frecuencia de 12 h, usando 200 mL de medio de cultivo por biorreactor en las dos frecuencias (Figura 4-6). Estos resultados son similares a lo reportado por varios autores donde señalan que periodos prolongados afectan el crecimiento y desarrollo de los brotes. En este contexto, The et al., (2019) al evaluar cinco tiempos de inmersión 30, 60, 90, 120 y 150 s en la micropropagación de clavel (*D. caryophyllus*), señalan que inmersión de 30 y 90 s incrementó la longitud de los brotes, en cambio, periodos de inmersión más cortos o largos afectaron negativamente su crecimiento y desarrollo. De igual manera, Regueira et al., (2018) consiguieron brotes más largos de sauce (*Salix viminalis*) con inmersión de 1 min al comparar con tiempos de inmersión prolongados.

En contraste con los resultados de este estudio, Alvarenga y Salazar (2015) muestran que una inmersión de 10 min cada 12 h presentan el mayor promedio de longitud (147,74 mm) de brotes, esto al comparar con una inmersión de 5 min (75,91 mm) frecuencia 12 h en la micropropagación de *S. rebaudiana*. Similares valores son reportados por Gatica y Weber (2013) quienes consiguen brotes más largos (4,9 cm) con 4 min de inmersión en comparación con 1 min (3,1 cm) y frecuencia de 6 h en *Humulus lupulus*. En cambio, Rachmi et al. (2019) muestran que 5 y 10 min de inmersión no difieren entre sí para la variable longitud del brote en *Aquilaria malaccensis*.

Existe varias investigaciones donde se evidencia que un tiempo de inmersión corto (2 min) es la condición más favorable para alcanzar una micropropagación exitosa, con niveles de hiperhidricidad aceptables o sin presencia de esta, tal como se evidenció en vainilla (*V. planifolia*) (Ramírez y Iglesias, 2016), en pera (*P. communis*) (Loffi et al., 2020), en anturio (*A. andreanum*) (Ramírez et al., 2019), orquídea (*G. skinneri*) (Leyva et al., 2020) y taro (*C. esculenta*) (Mancilla et al., 2021). De todo lo expuesto se puede concluir que cada especie requiere un tiempo de inmersión específico, sin embargo, la mayoría responden adecuadamente a un tiempo de inmersión breve (2 min).

4.2.2 Frecuencia de inmersión para longitud del brote

El crecimiento de brotes de *C. palmata* fue influenciado por la frecuencia de inmersión prolongada de 12 h (Figuras 4-5 y 4-6). Los niveles de los factores que mostraron mayores longitudes de brotes fueron frecuencia de 12 h, tiempo de inmersión de 3 min y 200 mL de medio de cultivo por biorreactor (40 mL/explante), con un promedio de 2,44 cm. Mientras que, las longitudes más cortas de los brotes se obtuvieron con frecuencia de 6 h, tiempo de inmersión 5 min en los tres volúmenes de medio evaluados (0,63 cm con 50 mL; 0,65 cm con 100 mL y 0,68 cm con 200 mL).

Los resultados aquí reportados coinciden con la literatura científica, aunque en otras especies, donde evidencian que el crecimiento y desarrollo de brotes se ve favorecido por frecuencias de inmersión prolongadas, sin embargo, estas frecuencias no siempre son las óptimas para alcanzar un mayor número de brotes por explante (Pramita et al., 2018; Arano et al., 2020). Una tendencia similar se observa en la micropropagación de *G. jamesonii* y banana (Rasthali AAB—Silk), intervalos de inmersión de 12 h aumenta el tamaño del brote en cambio frecuencias cortas incrementa el número de brotes por explante (Mosqueda et al., 2017; Uma et al., 2021).

En discrepancia con lo encontrado en esta investigación, Ramos et al., (2014) al evaluar diferentes frecuencias de inmersión (4, 8 y 12 h) en la micropropagación de vainilla (*V. planifolia*) mediante un sistema RITA, reportan mayor longitud y vigor de los brotes con un intervalo de inmersión corto de 4 h. Esta misma tendencia fue observada en la micropropagación de pitahaya (*H. undatus*) mediante un sistema BIT (Bello et al., 2021). Por el contrario, Martínez et al., (2019) no encontraron diferencias significativas en la longitud del brote de *A. andreaum* con inmersiones de 2 minutos cada 4, 8 y 12 h. Sin embargo recomienda una frecuencia de inmersión de 12 h para optimizar recursos y disminuir la tasa de hiperhidricidad.

Figura 4-5: Efecto de la frecuencia de inmersión en la longitud de brotes de *C. palmata*

Longitudes de Brotes obtenido en un Sistema BIT, después de 60 días de cultivo *in vitro*, con 200 mL de medio de cultivo por biorreactor, 3 min de inmersión y frecuencia de inmersión; **A:** 12 h y **B:** 6 h.

4.2.3 Volumen de medio de cultivo para longitud del brote

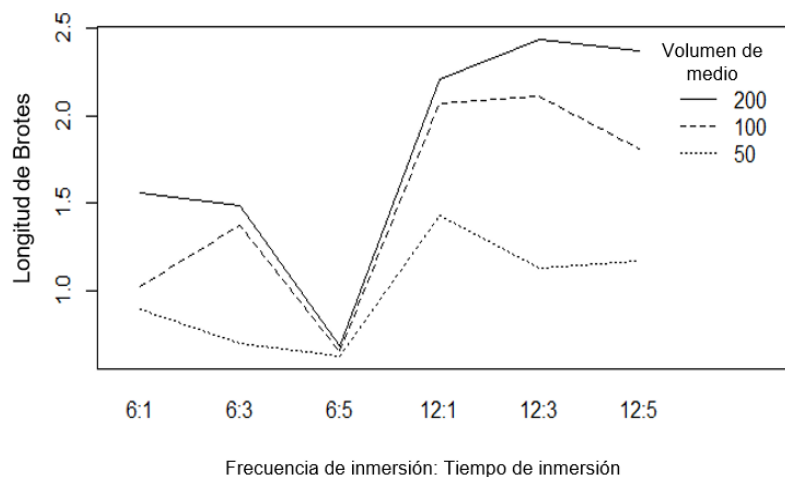
Un volumen de 200 mL de medio de cultivo (20 o 40 mL/ explante) fue la condición más deseada para inducir un mayor crecimiento de los brotes, en cada tiempo y frecuencia de inmersión evaluado. En cambio, un volumen de 50 mL (5 o 10 mL/explante) fue ineficiente en cada uno de los niveles de los demás factores estudiados (Figura 4-6). Varios autores reportan que volúmenes entre 20 y 50 mL de medio de cultivo por explante son los más adecuados para conseguir un buen desarrollo del material vegetal micropropagado. Así, Uma et al., (2021) revela que 250 mL de medio de cultivo por biorreactor (40 mL/explante) evidencia ser el mejor volumen para inducir mayor crecimiento de los brotes en el tipo de banana (Rasthali AAB—Silk) utilizando un sistema BIT, en cambio, volúmenes menores o mayores a este (16 y 83 mL) afectan el crecimiento de los nuevos brotes. Este mismo resultado reporta Arano et al., (2020) en *C. esculenta* donde 25 o 50 mL por explante favorece el desarrollo de los nuevos brotes en comparación con volúmenes más bajos y altos (12,5 y 100 mL por explante).

Diversas investigaciones evidencian que volúmenes de medio muy bajos (5 y 10 mL/explante) conducen a una disminución de la tasa de crecimiento y desarrollo de nuevos brotes (San José et al., 2020), tal como se ha observado en nuestros resultados. Por otro

lado, Martínez et al., (2019) en *A. andreanum* no reportaron diferencias significativas para la variable longitud del brote al evaluar diferentes volúmenes de medio por explante; sin embargo, sugieren que 25 mL es el mejor volumen desde el punto de vista económico. De igual manera, Ramos et al., (2014) reportaron que volúmenes de 25, 33,3 y 50 mL por explante se comportan estadísticamente iguales para la variable longitud del brote de vainilla (*V. planifolia*). Tendencia similar es observado en la micropropagación de limón (*Citrus x latifolia*) con volúmenes de 20, 30 y 40 mL por explante (Bulbarela et al., 2019).

De lo expuesto anteriormente se puede deducir que el volumen de medio por explante usado es un factor determinante en el crecimiento y desarrollo del material vegetal micropropagado mediante un SITA, sin embargo, es un factor que suele ser subestimado (Arano et al., 2020).

Figura 4-6: Interacción de segundo orden: Frecuencia de inmersión, tiempo de inmersión y volumen de medio por biorreactor, para longitud del brote



4.2.4 Densidad de explantes para longitud del brote

La densidad de 5 y 10 explantes por biorreactor no mostró diferencia significativa sobre el crecimiento de los brotes (Anexo B). Resultados similares son reportados por Monja et al., (2021) en la micropropagación de *A. angustifolia*, al evaluar densidades de 20 y 40 explantes por contenedor RITA. En cambio, Marchant et al., (2021) revelan que cuando el número de explantes por biorreactor aumenta, el área disponible para el crecimiento y desarrollo del material vegetal se ve reducida, obligando a los explantes a competir por

espacio, luz y nutrientes, lo que da como resultado una baja tasa de proliferación y desarrollo del cultivo (Bello et al., 2021). Aunque en algunos casos, la densidad del inóculo no es decisivo en términos fisiológicos y morfológicos, sí lo es en términos económicos, ya que una baja densidad de explantes provoca un desperdicio de nutrientes del medio de cultivo, con el consecuente desperdicio de recursos (Uma et al., 2021).

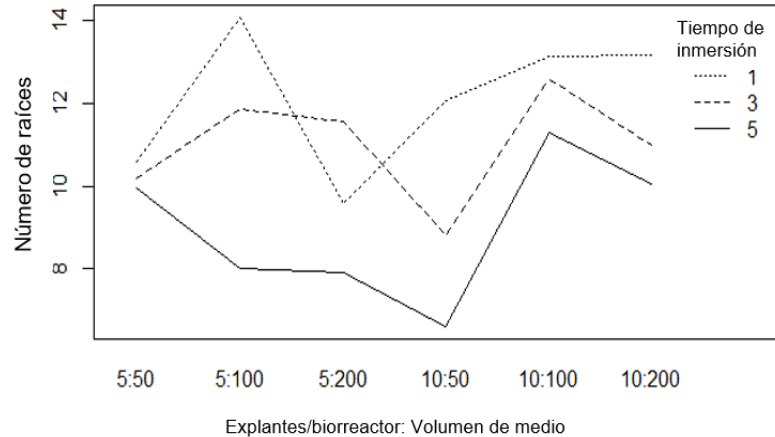
4.3 Variable de respuesta número de raíces

El análisis de varianza (ANOVA) (Anexo C), mostró diferencia estadística significativa para las interacciones de segundo orden, por lo que se procedió a analizar efectos simples de cada uno de los factores en estudio.

4.3.1 Tiempo de inmersión para número de raíces por explante

El tiempo de inmersión que mayores promedios mostró para la variable número de raíces fue 1 min, con 100 mL de medio de cultivo por biorreactor en cada uno de los niveles de inóculo de 5 y 10 explantes, con valores promedio de 14,05 y 13,12 raíces respectivamente. En el tratamiento con 5 explantes/biorreactor con 200 mL de medio de cultivo (40 mL/explante) mostró una tendencia diferente, ya que con una inmersión de 3 min indujo mayor número de raíces (11, 55) al comparar con un tiempo de 5 min (7,90). Además se observó que una inmersión de 5 min fue la condición menos adecuada para la generación de raíces (Figura 4-7). Resultados similares son reportados por The et al., (2019) en el cultivo de clavel (*D. caryophyllus*) al evaluar cinco tiempos de inmersión 30, 60, 90, 120 y 150 s, señalaron que inmersión de 90 s incrementa el número de raíces. Periodos de inmersión más cortos o largos afectan negativamente al sistema radical.

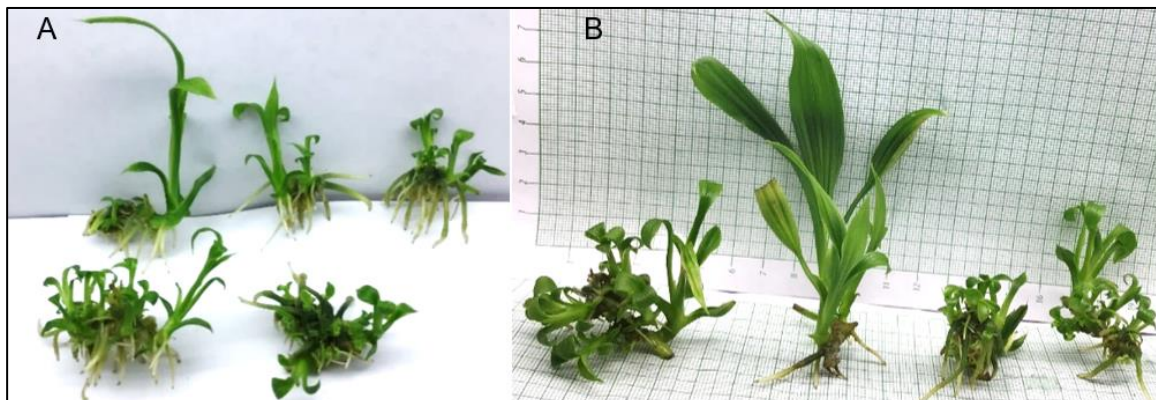
Figura 4-7: Interacción de segundo orden: número de explantes por biorreactor, volumen de medio por biorreactor y tiempo de inmersión, para la variable de respuesta número de raíces



4.3.2 Frecuencia de inmersión para número de raíces por explante

Los niveles de los factores más adecuados para incrementar el número de raíces por explante fueron frecuencia de 6 h con 100 y 200 mL de medio de cultivo y 10 explantes por biorreactor, con un promedio de 13, 26 y 13,33 raíces respectivamente. En cambio, una frecuencia de 12 h mostró ser la menos adecuada para la generación de raíces en los niveles de los factores evaluados (Figura 4-8 y 4-9). Contrariamente, Uma et al., (2021) no obtuvieron diferencias significativas entre frecuencias de inmersión de 4, 6 y 12 h para la variable número de raíces por explante en banano (Rasthali AAB—Silk). De igual manera, The et al., (2019) muestran que frecuencias de 2, 4 y 8 h no tienen efecto sobre la variable número de raíces de clavel 'Dreambyul'. Tendencia similar es observada por Aka et al., (2020) en el cultivo de arrayán (*M. communis*) aplicando dos frecuencias de inmersión (4 h y 8 h).

Figura 4-8: Efecto de la frecuencia de inmersión en la generación de raíces de *C. palmata*

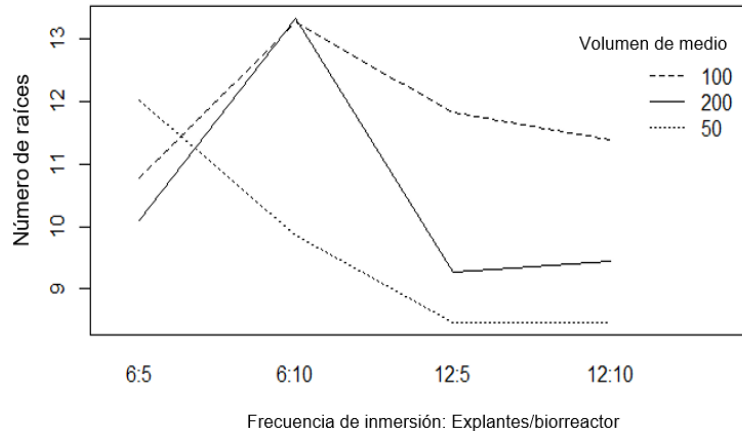


Sistema radical generado en las plántulas de *C. palmata* utilizando un sistema BIT, después de 60 días de cultivo in vitro, con 10 mL de medio por explante, 1 min de inmersión y frecuencia de inmersión; **A:** 6 h y **B:** 12 h.

4.3.3 Volumen de medio de cultivo para número de raíces por explante

El volumen de medio de cultivo que favoreció al incremento del número de raíces por explante fue 100 y 200 mL de medio de cultivo, 10 explantes por biorreactor y frecuencia de inmersión 6 h, con un promedio de 13,26 raíces. En cambio, el volumen que menos inducción de raíces evidenció fue el de 50 mL (5 mL/biorreactor), 10 explantes biorreactor y frecuencia de 6 h, con un promedio de 9,85 raíces. Al trabajar con frecuencia de 12 h, el volumen de medio que mayor número de raíces mostró fue el de 100 mL, con un promedio de 11,83 raíces con 5 explantes y 11,38 raíces con 10 explantes (Figura 4-9). Indicando que volúmenes de medio de cultivo escasos o muy altos afectaron negativamente a la inducción del sistema radical. Los resultados aquí reportados no coinciden con lo obtenido por Uma et al., (2021) en banano (Rasthali AAB—Silk), quienes no reportan diferencias significativas entre 100, 250 y 500 mL de medio de cultivo para la variable número de raíces.

Figura 4-9: Interacción de segundo orden: Frecuencia de inmersión, número de explantes por biorreactor y volumen de medio por biorreactor, para la variable de respuesta número de raíces

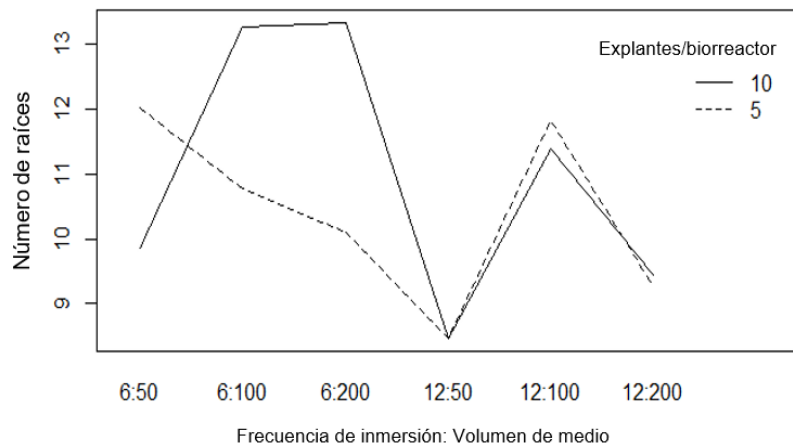


4.3.4 Densidad de explantes para la variable número de raíces

Las condiciones más deseable para incrementar el número de raíces por explante fue densidad de 10 explantes, con 100 y 200 mL de medio de cultivo por biorreactor y frecuencia de 6 h, con 13,26 y 13,33 raíces respectivamente. Por otro lado, se observó una excepción, donde una densidad de 5 explantes incrementó el número de raíces (12,03) al comparar con inóculo de 10 explantes, con 50 mL de medio y frecuencia 6 h, con un promedio de 9, 85 raíces. En cambio, las dos densidades de explantes no mostraron diferencias significativas en el número de raíces generados bajo una frecuencia de 12 h (Figura 4-10).

De acuerdo con nuestros resultados, Marchant et al., (2021) en la micropropagación a gran escala de cúrcuma (*C. longa*) mediante un BIT de 1 L de capacidad, reportó que un inóculo inicial de 30 explantes por biorreactor arrojó el mayor número de raíces en comparación con un inóculo de 20 explantes por biorreactor. Una posible explicación a los resultados encontrados puede ser que al utilizar un mayor número de explantes por biorreactor, el material vegetal comienza a competir por nutrientes y espacio para adaptarse a las condiciones adversas, lo que resulta a una mayor generación de raíces con el fin de aprovechar al máximo los nutrientes.

Figura 4-10: Interacción de segundo orden: Frecuencia de inmersión, volumen de medio por biorreactor y número de explantes por biorreactor, para la variable de respuesta número de raíces



4.4 Variable de respuesta longitud de raíces

El análisis de varianza (ANOVA) (Tabla D), mostró diferencia estadística significativa para las interacciones de segundo orden, por lo tanto, se procedió analizar efectos simples de cada uno de los factores en estudio.

4.4.1 Tiempo de inmersión para longitud de raíces por explante

La condición más favorable para conseguir mayor longitud de raíces fue un tiempo de inmersión de 1 min, con 100 mL de medio por biorreactor (10 o 20 mL/biorreactor) y frecuencia de inmersión de 12 h, con un promedio de 1,57 cm. Por otro lado, se observó que una inmersión de 5 min fue la condición menos adecuada en la generación de raíces, en los tres volúmenes de medio y frecuencia de inmersión de 6 h (Figuras 4-11 y 4-12). Resultados similares fueron reportados por The et al., (2019) en clavel (*D. caryophyllus*), al evaluar cinco tiempos de inmersión, señalando que inmersión de 60 y 90 s incrementó la longitud de las raíces. Periodos de inmersión más cortos o largos afectaron negativamente al desarrollo del sistema radical.

Figura 4-11: Influencia del tiempo y frecuencia de inmersión en el crecimiento del sistema radical de *C. palmata*



Longitud de raíces generadas mediante un sistema BIT, después de 60 días de cultivo *in vitro*, con 100 mL de medio de cultivo y 10 explantes por biorreactor **A:** inmersión 1 min cada 12 h y **B:** inmersión 5 min cada 6 h.

4.4.2 Volumen del medio de cultivo para longitud de raíces por explante

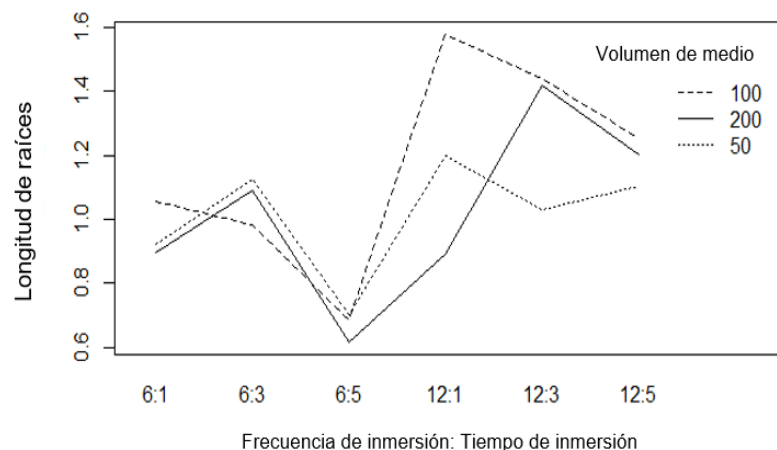
Un volumen de 100 mL fue el más adecuado para inducir un mayor crecimiento de raíces en cada tiempo y frecuencia de inmersión. La mayor longitud de raíces (1,57 cm) se obtuvo con 100 mL de medio de cultivo (10 mL/explante), tiempo de inmersión 1 min y frecuencia 12 h. Por otro lado, no se observó diferencias estadísticas significativas entre volúmenes de medio al ser evaluado en los dos niveles de frecuencia y tiempo de inmersión de 5 min, evidenciando los promedios más bajos 0,70 con 50 mL; 0,68 con 100 mL y 0,61 cm con 200mL, frecuencia de 6 h (Figura 4-12). Contrariamente a lo aquí reportado, Uma et al., (2021) reportan que la longitud de la raíz no es afectada por el volumen del medio utilizado en banano.

4.4.3 Frecuencia de inmersión para longitud de raíces por explante

Una frecuencia de inmersión prolongada de 12 h mostró ser la condición más adecuada para inducir un mayor crecimiento de raíces. El promedio más alto obtenido fue de 1,57 cm con frecuencia de 12 h, 1 min de inmersión, en 100 mL de medio de cultivo (10 mL/ explante), seguido de un tiempo de inmersión de 3 min, con un promedio de 1, 44 cm con 100 mL y 1,41 cm con 200 mL de medio de cultivo. En cambio, la frecuencia de inmersión 6 h mostró ser la menos adecuada para la generación de raíces (Figura 4-12). Resultados similares, son reportados por Uma et al., (2021) quienes indican que la longitud de la raíz fue significativamente mayor con frecuencia de inmersión de 12 h al comparar con un intervalo de 6 h en el cultivo de banano (Rasthali AAB—Silk). Tendencia similar, reportan Aka et al., (2020) en el cultivo de arrayán (*M. communis*), donde una frecuencias de inmersión prolongada (8 h) indujo mayor longitud de raíces en comparación con una frecuencia corto (4 h).

Las plantas responden a estrés hídrico con un incremento de los niveles de carotenoides y regulación de la síntesis del ácido abscísico, mismo que se sintetiza en el sistema radical. Esta fitohormona es la encargada de otorgar al material vegetal tolerancia al estrés por sequía (Taiz y Zeiger, 2006), por ello, se puede deducir que en un mayor intervalo de inmersión, las raíces de las plantas comienzan a sintetizar ácido abscísico, como mecanismo de tolerancia a las condiciones adversas, lo que podría estimular un incremento en longitud de las raíces, por acción de esta fitohormona.

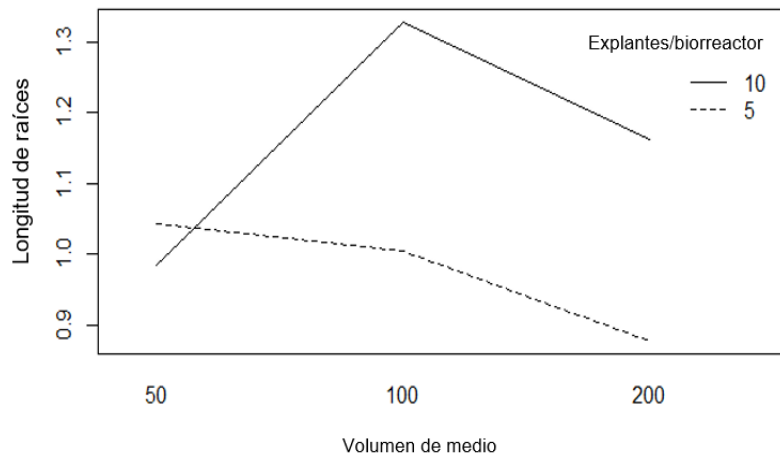
Figura 4-12: Interacción de segundo orden: frecuencia de inmersión, tiempo de inmersión y volumen de medio por biorreactor para la variable longitud de raíces



4.4.4 Densidad de explantes para longitud de raíces por explante

Una densidad de 10 explantes por biorreactor evidenció favorecer positivamente al crecimiento y desarrollo del sistema radical. El mejor promedio para la longitud de raíces se obtuvo bajo las condiciones de 10 explantes con 100 y 200 mL de medio de cultivo por biorreactor (10 o 20 mL/explante), alcanzando promedios de 1,32 y 1,16 cm respectivamente. En cambio, una densidad de 5 explantes por biorreactor mostro los menores promedios para la variable longitud de raíz al ser evaluado con 100 y 200 mL de medio de cultivo por biorreactor (20 y 40 mL/ explante) con un promedio de 1,00 y 0,87 cm consecutivamente (Figura 4-13). Una posible explicación a estos resultados puede ser que, al incrementar la densidad de explantes, el material vegetal se ve sometido a mayores niveles de estrés debido a la disminución de espacio y nutrientes lo que originaría que las plantas respondan a estas condiciones adversas con mayor desarrollo del sistema radical.

Figura 4-13: Interacción de primer orden: volumen de medio por biorreactor y número de explantes por biorreactor, para la variable longitud de las raíces



4.5 Variable de respuesta número de hojas

El análisis de varianza (ANOVA) (Anexo E), mostró diferencia significativa para las interacciones de primer orden, por lo que se analizó efectos simples de cada uno de los factores en estudio.

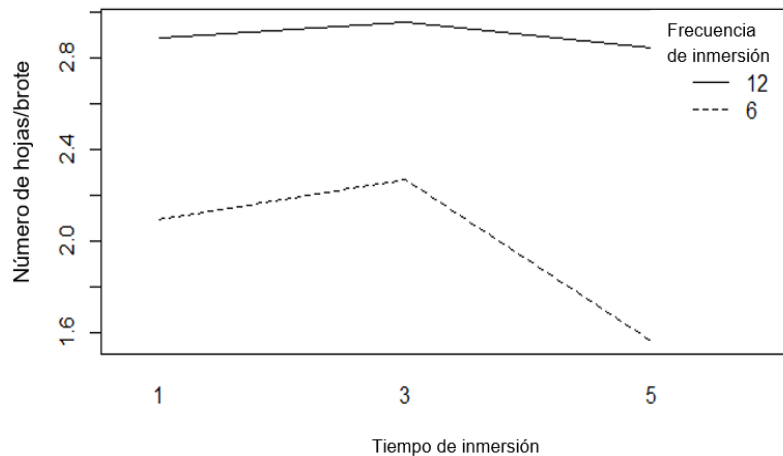
4.5.1 Tiempo de inmersión para número de hojas

El tiempo de inmersión no mostró inferir en el número de hojas por explante generadas al ser evaluados bajo una frecuencia de 12 h. En cambio, un tiempo de inmersión de 5 min mostro ser la condición menos adecuada para el número de hojas por explante, con un promedio de 1,6 hojas bajo frecuencia de 6 h (Figura 4-14). Contrariamente a lo aquí reportado, Alvarenga y Salazar (2015), reportan un mayor número de hojas (36,40 hojas) de *S. rebaudiana* Bertoni con inmersión prolongada (10 min) al comparar con un periodo de inmersión corta (5 min) (22,83 hojas). Estos mismos autores al utilizar un sistema BIT observan similar comportamiento, 10 min de inmersión incrementa el número de hojas por explante (26,89 hojas) en comparación con una inmersión de 5 min (12,99 hojas).

4.5.2 Frecuencia de inmersión para número de hojas

La frecuencia de inmersión prolongada 12 h incrementó el número de hojas por explante, en cada uno de los tiempos de inmersión evaluados, al comparar con una frecuencia corta de 6 h que mostró los promedios más bajos para esta variable (Figura 4-18 y 4-20). Existen estudios donde una frecuencia de inmersión de 12 h favorece la obtención de un mayor número de hojas por explante, en especies como malanga (*C. esculenta*) (Arano et al., 2020) y espinaca longeva (*G. procumbens*) (Pramita et al., 2018). Por el contrario, Alvarenga y Salazar (2015) registran un mayor número de hojas con un intervalo de inmersión corto (8 h) en comparación con una larga (12 h). Por otro lado, investigaciones realizadas en orquídea (*G. skinneri*) (Leyva et al., 2020), en vainilla (*V. planifolia*) (Ramos et al., 2014) y en anturio (*A. andreanum*) (Martínez et al., 2019) muestran que no existe diferencias significativas entre intervalos de inmersión de 4, 6 y 12 h para la variable número de hojas por explante.

Figura 4-14. Interacción de primer orden: tiempo de inmersión y frecuencia de inmersión, para la variable de respuesta número de hojas por explante



4.5.3 Volumen de medio de cultivo para número de hojas

El volumen de 200 mL de medio de cultivo fue la mejor condición para generar el mayor número de hojas en cada tiempo de inmersión evaluado. El mejor promedio para esta variable de respuesta fue el tratamiento 200 mL de medio de cultivo (20 y 40 mL/ explante) con inmersión de 3 min. En cambio, un menor número de hojas se obtuvo con 50 mL de medio (5 mL/explante), en cada tiempo de inmersión (Figura 4-15 y 4-16). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Arano et al., (2020) quienes indican volúmenes de medio altos incrementa el número de hojas por explante y la cantidad de pigmentos fotosintéticos. Este efecto podría explicarse por el hecho de que a mayor volumen de medio mayor disponibilidad y consumo de nutrientes que componen la molécula de clorofila. De igual manera, Leyva et al., (2020) utilizó un sistema BIT en la multiplicación *in vitro* de orquídea (*G. skinneri*) obtuvieron tres hojas por explante, con un volumen de 20 mL/explante en comparación de 1,5 hojas al usar volúmenes de medio menores.

En desacuerdo con nuestros resultados, Bulbarela et al., (2019) al micropropagar limón (*Citrus x latifolia*) reportó que 20 y 30 mL/explante de medio de cultivo formaron un mayor número de hojas (6,20 hojas/explante) en comparación de un volumen de 40 mL (3,69 hojas/explante). Por otro lado, Martínez et al., (2019) y Ramos et al., (2014) experimentando con *A. andreaum* y *V. planifolia* respectivamente, no reportan diferencias significativas en el número de hojas por explante al evaluar diferentes volúmenes de medio de cultivo.

Figura 4-15: Interacción de primer orden: tiempo de inmersión y volumen de medio de cultivo por explante, para la variable de respuesta número de hojas por explante

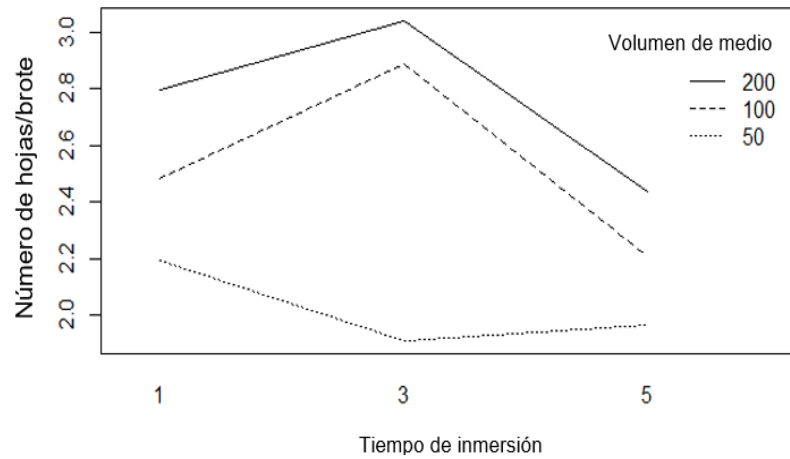
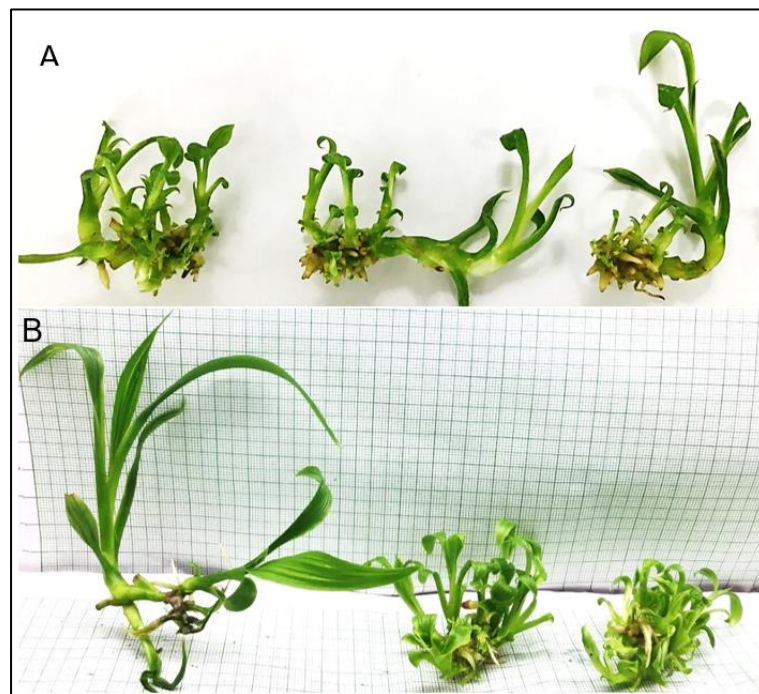


Figura 4-16: Influencia de la frecuencia y volumen de medio de cultivo en la inducción de hojas de *C. palmata*



Número de hojas generadas mediante un sistema BIT, después de 60 días de cultivo *in vitro*, con inmersión de 3 min. **A:** con 10 mL de medio de cultivo por explante y frecuencia de inmersión de 6 h. **B:** con 20 mL de medio de cultivo 12 h.

4.5.4 Número de explantes para número de hojas

La densidad de explantes por biorreactor no mostró diferencia significativa al ser evaluado en cada nivel de los demás factores (Anexo E). Resultados similares son reportados por Monja et al., (2021) en micropropagación de *Agave angustifolia*, quienes indican que el número de explantes por biorreactor BIT no influye en el número de hojas obtenidos. En discrepancia con nuestros resultados, Marchant et al., (2021) señalan que un inoculo inicial de 30 explantes por biorreactor supera a los tratamientos con 20 y 40 explantes/biorreactor con un mayor número de hojas por explante.

4.6 Variable de respuesta peso seco del cultivo

El análisis de varianza (ANOVA) (Anexo F), mostró diferencia estadística significativa para interacción de tercer orden, por lo tanto, se procedió analizar efectos simples de los factores en estudio.

4.6.1 Tiempo de inmersión para peso seco del cultivo

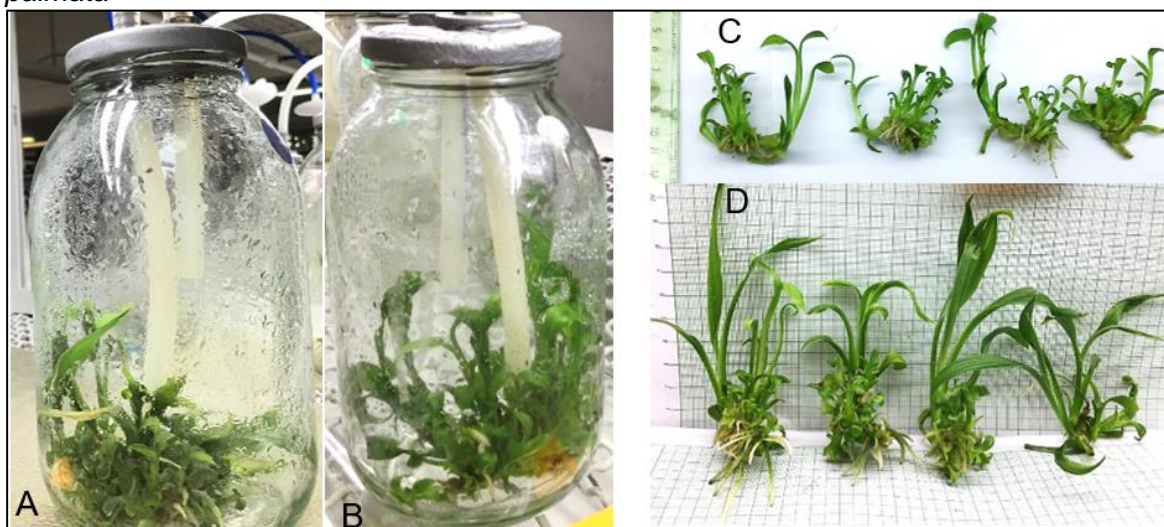
Un tiempo de inmersión de 1 min, 200 mL de medio de cultivo, frecuencia 12 h y 10 explantes mostró ser la condición más adecuada para incrementar la cantidad de biomasa, evidenciando el mejor promedio 1,36 g, seguido de un tiempo de inmersión de 3 min con 1,20 g, y finalmente un tiempo de inmersión de 5 min mostró ser la condición menos deseada, evidenciando los promedios más bajos para esta variable de respuesta, tal como muestra la Figura 4-18.

Resultados similares reporta Gatica y Weber (2013) en *H. lupulus* quienes obtienen un mayor peso seco (1,3 g) con inmersión de 1 minuto, en comparación de una inmersión de 4 min (0,7). De igual manera, The et al., (2019) consiguen un incremento de biomasa con inmersiones de 60 y 90 s, indicando que tiempos de inmersión más cortos o largos disminuyen el crecimiento y desarrollo del clavel Dreambyul. Resultados diferentes son reportados por Alvarenga y Salazar (2015) obtienen mayor peso seco de *S. rebaudiana*, con tiempos de inmersión más prolongados, mostrando el mejor promedio (83,41 mg) para esta variable con inmersión de 10 min en comparación de 5 min (14,79 mg).

4.6.2 Frecuencia de inmersión para peso seco del cultivo

Frecuencia de inmersión larga 12 h mostró ser la condición más adecuada para incrementar el peso seco del cultivo, en cada nivel de los demás factores evaluados (Fig. 36). Una frecuencia de 12 h evidenció el mayor promedio de peso seco con 1,36 g en comparación con frecuencia corta de 6 h, que generó los valores más bajos en cada uno de los niveles de los demás factores evaluados (Figura 4-17 y 4-18). De acuerdo con nuestros resultados, Aka et al., (2020) reportan un incremento del peso seco del cultivo de arrayán (*M. communis*) con intervalos de inmersión largos (8 h/0,26 mg) al comparar con uno corto (4 h/0,11 mg). Contrariamente, estudios realizados en anturio (*A. andreanum*) (Martínez et al., 2019), en estevia (*S. rebaudiana*) (Alvarenga y Salazar, 2015) y en espinaca longeva (*G. procumbens*) (Pramita et al., 2018) reportan que la frecuencia de inmersión no influye en el incremento de biomasa del cultivo. Dejando claro que la frecuencia de inmersión óptima varía considerablemente de acuerdo con la especie, proceso de micropropagación y tipo de SITA utilizado (Etienne y Berthouly 2002).

Figura 4-17: Efecto de la frecuencia de inmersión en el incremento del peso seco de *C. palmata*



A-B: Biorreactores de inmersión temporal BIT sosteniendo plántulas de *C. palmata* después de 60 días de cultivo, regeneradas con inmersión de 1 min, en 40 mL de medio de cultivo por explante y frecuencia de inmersión, **A-C:** 6 h y **B-D:** 12 h.

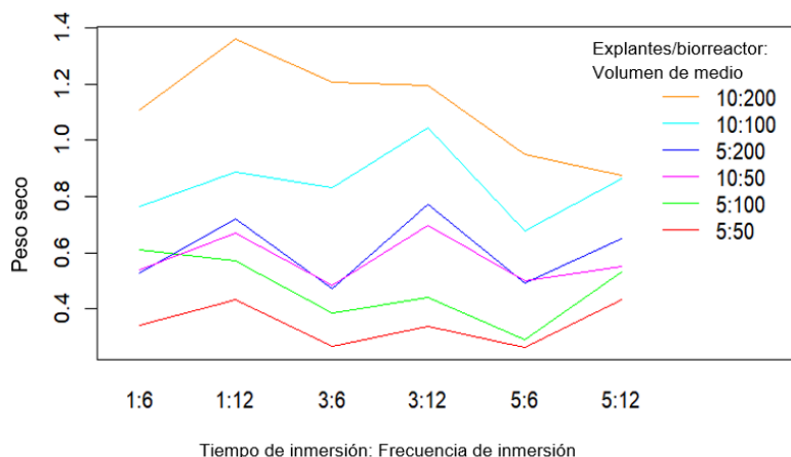
4.6.3 Volumen de medio de cultivo para peso seco del cultivo

Un volumen de 200 mL de medio de cultivo por biorreactor (20 mL/explante) mostró ser la condición más deseable para incrementar el peso seco del cultivo, esto al ser evaluado en cada nivel de los demás factores en estudio. Por otro lado, 50 mL de medio de cultivo por biorreactor (5 mL/explante) evidenció ser el volumen que afectó negativamente al incremento del peso seco del cultivo, ya que generó los valores más bajos (Figura 4-18). Gatica y Weber (2013) presentan una tendencia opuesta a nuestros resultados, donde un volumen de medio por explante bajo (4 mL) incrementa el mayor peso seco (0,7 g) en comparación con un mayor volumen de medio por explante (8 mL) (0,4 g) en *A. andreanum*.

4.6.4 Densidad de explantes para peso seco del cultivo

Una densidad de 10 explantes por biorreactor incrementó la cantidad de peso seco del cultivo, en comparación con una densidad de 5 explantes, esto al ser evaluado en cada volumen de medio, tiempo y frecuencia de inmersión (Figura 4-18). Ramírez et al. (2016) en la micropropagación de vainilla (*V. planifolia*) mediante un sistema BIT con un inculo inicial de 10 explantes/biorreactor consiguen mayor promedio de biomasa al comparar con otros sistemas de inmersión (RITA y BIG). En discrepancia con nuestros resultados, Monja et al., (2021) no observaron diferencias significativas para la variable peso seco al evaluar un inculo inicial de 20 y 40 explantes/biorreactor.

Figura 4-18: Interacción de tercer orden: frecuencia, tiempo de inmersión, número de plantas por biorreactor y volumen de medio de cultivo por biorreactor, para la variable de respuesta Biomasa

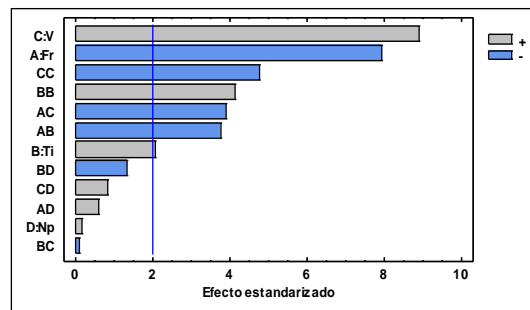


4.7 Análisis mediante superficie de respuestas

4.7.1 Valores óptimos estimados para número de brotes por explante

En la figura 4-19 muestra las diferencias estadísticas significativas que se obtuvieron para cada factor en estudio, ordenado de lo más significativo a lo menos significativo. El modelo se ajustó 77,12 %. El diagrama de Pareto muestra que el volumen del medio de cultivo es un factor determinante para incrementar el número de brotes por explante ($p = 0,0000$), seguido de la frecuencia de inmersión ($p = 0,0000$). En cambio, el tiempo de inmersión mostró tener un mínimo efecto sobre esta variable ($p = 0,0426$). Por otro parte, la densidad de explantes por biorreactor (N_p) no fue significativo ($p = 0,8654$). Esto indica que el número de brotes por explante de *C. palmata* está fuertemente determinado por el volumen de medio de cultivo, frecuencia y tiempo de inmersión.

Figura 4-19: El diagrama de Pareto estandarizado para la variable número de brotes por explante de *C. palmata* a los 60 días de cultivo *in vitro*



Para lograr la optimización de la variable de respuesta número de brotes por explante, el modelo completo de superficie de respuesta de segundo orden generó una nueva condición de estudio (óptimo). Pronosticando que, si se trabaja con los niveles de los factores sugeridos se conseguirá un estimado de 11,21 brotes (Tabla 4-1).

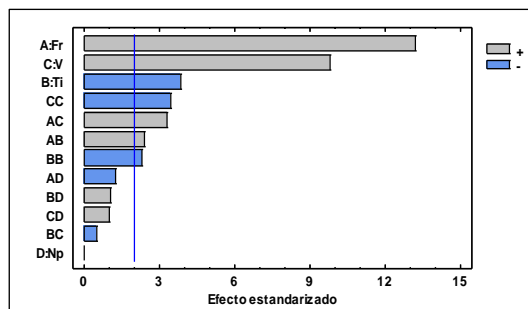
Tabla 4-1: Valores óptimos de los factores para obtener 11,21 brotes por explante

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Frecuencia	6	12	6,0 h
Tiempo de inmersión	1	5	5,0 min
Volumen de medio	50	200	171,6 mL
Densidad de explantes	5	10	10,0

4.7.1 Valor óptimo estimado para la variable longitud del brote

La Figura 4-20 muestra que la frecuencia de inmersión fue el factor más importante en el crecimiento y desarrollo de los nuevos brotes ($p = 0,0000$), seguido del volumen de medio ($p = 0,0000$) y finalmente el tiempo de inmersión que mostró menor influencia para esta variable ($p = 0,0003$). La densidad de explantes evaluadas no mostró diferencia significativa ($p = 0,9822$). El modelo se ajustó 83,78 %.

Figura 4-20: El diagrama de Pareto estandarizado para la variable longitud de brotes por explante de *C. palmata* a los 60 días de cultivo *in vitro*



Con el fin de optimizar la variable de respuesta longitud de brotes, el modelo completo de superficie de respuesta generó un nuevo valor de tiempo de inmersión y volumen de medio, sugiriendo que esta nueva condición de cultivo permitirá conseguir brotes de 2,51 cm de longitud (Tabla 4-2).

Tabla 4-2: Valores óptimos de los factores para obtener una longitud de brote máxima de 2.51 cm, según el módulo de optimización.

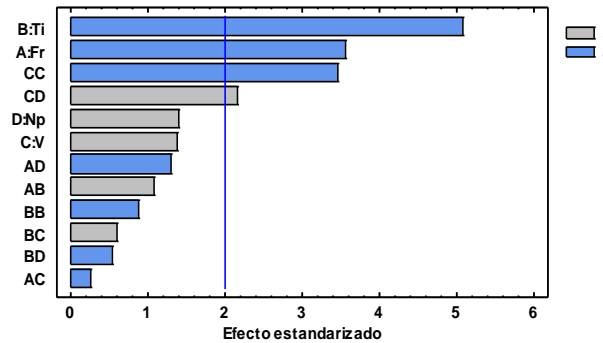
Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Frecuencia	6	12	12,0 h
Tiempo de inmersión	1	5	2,2 min
Volumen de medio	50	200	192,3 mL
Densidad de explantes	5	10	10,0

4.7.1 Valor óptimo estimado para la variable número de raíces por explante

La Figura 4-21 expone las significancias estadísticas de cada variable dependiente, ordenado de lo más significativo a lo menos significativo. El modelo se ajustó 51,48 %. El

diagrama de Pareto sugiere que el factor determinante para incrementar el número de raíces por explante fue el tiempo de inmersión ($p = 0,0000$), seguido por la frecuencia ($p = 0,0007$). En cambio, el volumen de medio ($p = 0,1706$) y la densidad de explantes por biorreactor ($p = 0,1692$) evidenciaron no incidir en el número de raíces por explante generadas.

Figura 4-21: El diagrama de Pareto estandarizado para la variable número de raíces por explante de *C. palmata* a los 60 días de cultivo *in vitro*



El modelo completo de superficie de respuesta sugirió que se trabaje bajo una nueva condición de cultivo (óptimo) para maximizar la variable de respuesta número de raíces por explante, niveles de los factores que permitirán conseguir un estimado de 15 raíces por explante (Tabla 4-3).

Tabla 4-3: Valores óptimos para obtener 15,65 raíces por explante

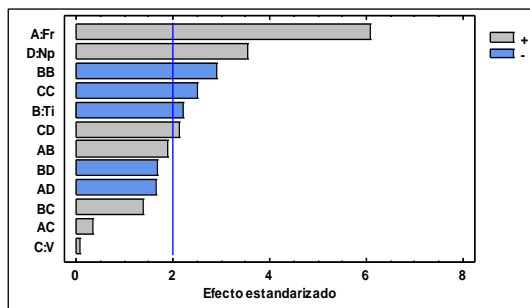
Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Frecuencia	6	12	6,0 h
Tiempo de inmersión	1	5	1,0 min
Volumen de medio	50	200	140,0 mL
Densidad de explantes	5	10	10,0

4.7.1 Valor óptimo estimado para la variable longitud de raíces

La Figura 4-22 evidenció la influencia de cada uno de los factores en estudio en la variable longitud de raíces, ordenado de lo más significativo a lo menos significativo. El modelo se ajustó a 58,89 %. Demostrando que la frecuencia de inmersión es el factor determinante para incrementar la longitud de las raíces ($p = 0,0000$), seguido de la densidad de explantes

por biorreactor ($p = 0,0008$), tiempo de inmersión ($p = 0,0303$) y finalmente el volumen de medio de cultivo no mostró influir para la longitud de raíces ($p = 0,9317$).

Figura 4-22: El diagrama de Pareto estandarizado para la variable longitud de raíces por explante de *C. palmata* a los 60 días de cultivo *in vitro*



Para optimizar la variable de respuesta longitud de raíces el modelo completo de superficie de respuesta mostró un nuevo nivel de tiempo de inmersión y volumen de medio de cultivo para conseguir una longitud de 1,53 cm de longitud de raíces (Tabla 4-4).

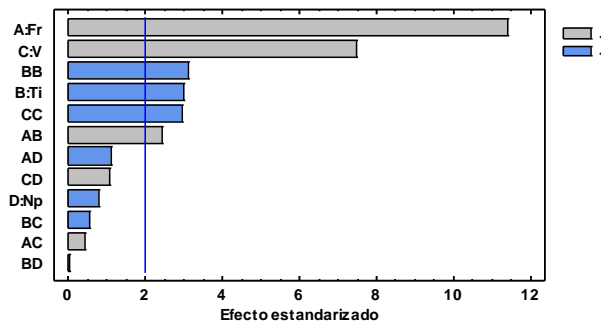
Tabla 4-4: Valores óptimos para obtener una longitud máxima de raíces de 1,53 cm

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Frecuencia	6	12	12 h
Tiempo de inmersión	1	5	2,7 min
Volumen de medio	50	200	143,3 mL
Densidad de explantes	5	10	10

4.7.1 Valor óptimo estimado para la variable número de hojas por explante

El diagrama de Pareto muestra que la frecuencia de inmersión es el factor que mayor influencia tuvo en esta variable ($p = 0,0000$), seguido del volumen de medio ($p = 0,0000$) y tiempo de inmersión ($p = 0,0041$). En cambio, la densidad de explantes por biorreactor no influye en el número de hojas por explante obtenido ($p = 0,4211$). El modelo se ajustó a 78,63 %.

Figura 4-23: El diagrama de Pareto estandarizado para la variable número de hojas por brote de *C. palmata* a los 60 días de cultivo *in vitro*



El modelo completo de superficie de respuesta evidenció una nueva condición de estudio si se desea maximizar la variable de respuesta número hojas por brote, si se trabaja bajo esta condición de cultivo, se obtendrá un estimado de 3,49 hojas por brote (Tabla 4-5).

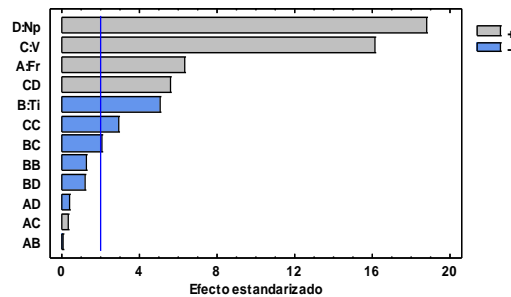
Tabla 4-5: Valores óptimos de los factores para obtener 3, 49 hojas por brote

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Frecuencia	6	12	12,0 h
Tiempo de inmersión	1	5	2,8 min
Volumen de medio	50	200	169,8 mL
Densidad de explantes	5	10	10,0

4.7.2 Valor óptimo estimado para la variable biomasa

Con el diagrama de Pareto se jerarquizó las significancias de cada uno de los factores en estudio ordenado de lo más significativo a lo menos significativo (Figura 4-24). El modelo se ajustó 92,18 %. Mismo que indicó que la densidad de explantes por biorreactor fue el factor de mayor impacto sobre la variable peso seco ($p = 0,0000$), seguido del volumen de medio de cultivo ($p = 0,0000$), la frecuencia de inmersión ($p = 0,0000$) y el tiempo de inmersión ($p = 0,0000$).

Figura 4-24. El diagrama de Pareto estandarizado para la variable peso seco de *C. palmata* a los 60 días de cultivo *in vitro*



Para lograr la optimización de la variable de respuesta peso seco del cultivo, el modelo completo de superficie de respuesta recomendó trabajar con frecuencia 12 h, tiempo de inmersión 1 min, volumen de medio de cultivo 200 mL y densidad de explantes 10. Ya que esta condición fue la que presentó mayor incremento de peso seco (Tabla 4-6).

Tabla 4-6: Valores óptimos para conseguir 1, 28 g de peso seco

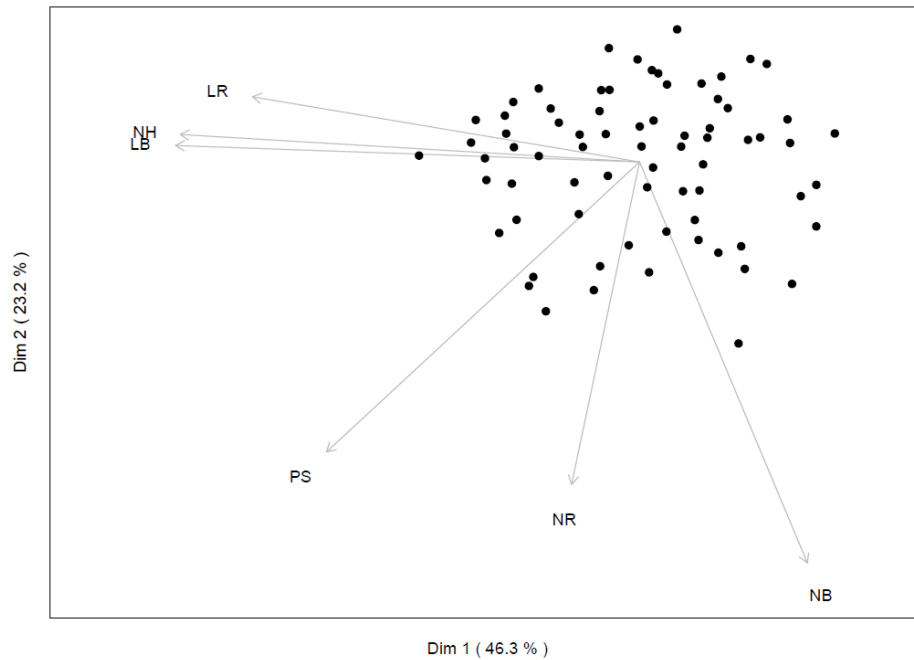
Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Frecuencia	6	12	12,0 h
Tiempo de inmersión	1	5	1,0 min
Volumen de medio	50	200	200,0 mL
Densidad de explantes	5	10	10,0

4.8 Análisis de correlación

A partir de las correlaciones por pares entre las seis variables de respuesta, es posible estructurar varios grupos. El primero está conformado por variables que exhiben una alta correlación positiva: Longitud del brote y número de hojas por explante (0,9), número de hojas y longitud de la raíz (0,5), longitud del brote y longitud de la raíz (0,5), y longitud del brote y peso seco (0,5). El segundo grupo incluye variables con una correlación positiva más débil: Número de hojas por explante y peso seco (0,4), Longitud de la raíz y peso seco (0,4), Número de raíces y peso seco (0,2), y Número de brotes y número de raíces (0,2). Finalmente, el tercer grupo está conformado por variables que exhiben correlación negativa: Número de Hojas y Número de Brotes (-0,2), Número de Brotes y Longitud de Brotes (-0,2), y Número de Brotes y Longitud de Raíces (-0,4) (Figura 4-25). Las correlaciones observadas evidencian que los niveles óptimos de los factores que potencian

as variables número de brotes y número de raíces por explante no son los mismos que exigen las variables longitud del brote, longitud de la raíz, número de hojas y peso seco.

Figura 4-25. Correlaciones más representativas entre las seis variables de respuesta analizadas



4.9 Optimización de múltiples variables de respuesta

Se buscó conciliar simultáneamente las seis variables de respuesta a partir de los promedios máximos y mínimos obtenidos, con el fin de generar una sola condición que ayude a potenciar las seis variables de respuesta evaluadas (Tabla 4-14). Se asignó ponderación a cada variable, en función de la importancia en el proceso de multiplicación *in vitro* de la especie (Tabla 4-17).

Tabla 4-7: Valores de ponderación asignados a cada variables de respuesta evaluada en la micropropagación de *C. palmata*

Variables de Respuesta	Mínimo observado	Máximo observado	Impacto
NB	2,1	12,8	5,0
LB	0,5	2,88	4,0
NR	4,6	15,7	2,0
LR	0,47	1,86	2,0
NH	1,4	4,11	4,0
PS	0,25	1,41	5,0

Al integrar los modelos de superficie de respuesta ajustados para cada una de las variables dependientes, encontramos que combinando una frecuencia de inmersión de 12 h, con un tiempo de inmersión de 1 min, un volumen de medio de cultivo de 171 mL y una densidad de 10 explante se espera optimizar el conjunto de respuestas medias, así: 7,23 brotes, con una longitud de 2,30 cm, 12,23 raíces con una longitud de 1,38 cm, 3,18 hojas y un peso seco de 1,22 g.

4.10 Comparación de tres métodos de micropropagación

4.10.1 Número de brotes por explante

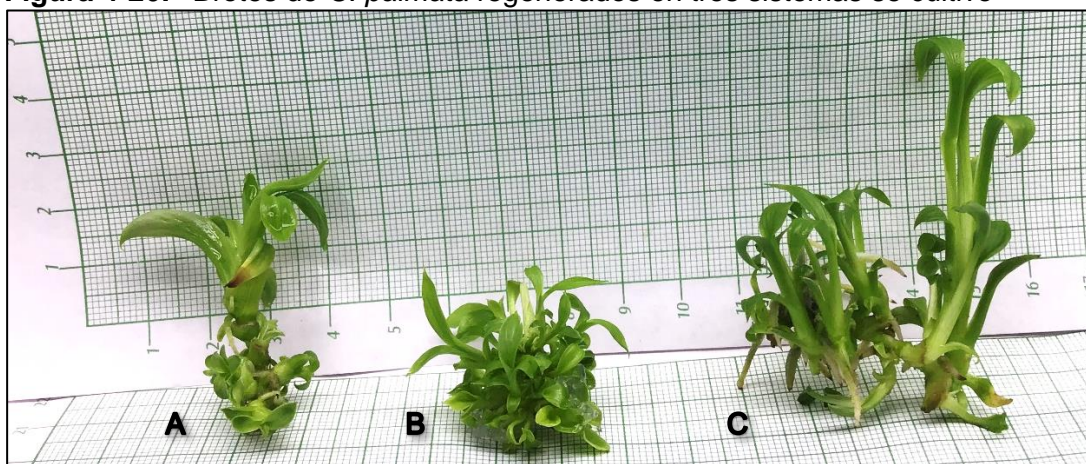
Los promedios registrados para la variable número de brotes cumplió con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas de acuerdo con la prueba Shapiro-Wilk ($p = 0.2095$) y Levene ($p = 0,283$). El Análisis de Varianza (ANOVA) (Anexo G), evidenció que el número de brotes por explante difirió en al menos dos métodos de micropropagación (sistema BIT, sólido y líquido) ($p = <2e-16$). Se utilizó la prueba de Tukey al 5 % para las comparaciones entre tratamientos donde se detectó 3 rangos de significancia (Anexo H).

El medio semisólido mostró el mayor promedio para esta variable con 10,29 brotes por explante, seguido del sistema BIT con inmersión de 1 y 3 min con promedio de 7,29 y 6,05 brotes y finalmente el medio líquido presentó el promedio más bajo con 3,50 brotes por explante (Figura. 4-31- A). En este estudio, el sistema TIB no aumenta el número de brotes por explante de *C. palmata*, sin embargo, este favoreció a todas las demás variables evaluadas. Estos resultados coinciden con los reportados por Ghosh et al. (2021) en la micropropagación de arándano rojo (*Vaccinium spp* L), reportando que un SITA no incrementa el número de brotes por explante en comparan con medio semisólido. Asimismo, Abahmane (2020) indicó que el uso de un SITA es efectivo para aumentar la longitud de los brotes y las raíces, sin embargo, no induce un mayor número de brotes por explante de palmera datilera (*Phoenix dactylifera* L).

Contrariamente, Leyva et al., (2020) al evaluar diferentes sistemas de cultivo *in vitro* (semisólido, líquido e inmersión temporal) en la micropropagación de *G. skinneri* reportan haber conseguido un mayor número de brotes en el sistema BIT (6 brotes), seguido del medio semisólido (3 brotes) y finalmente el medio líquido con inmersión parcial (2 brotes),

lo que evidencia que el medio líquido es la condición menos adecuada para incrementar la tasa de multiplicación, coincidiendo con nuestros resultados al utilizar medio líquido con inmersión parcial (Figura 4-26). Por otro lado, Hoyos et al. (2020) al evaluar diferentes concentraciones de BAP en la formación y desarrollo de nuevos brotes de plántulas de *C. palmata* consiguieron un mayor número (17 ± 3) y longitud (4, 8 cm) de brotes usando medio de cultivo semisólido suplementado con 2 mg L^{-1} de BAP. Sin embargo otras especies filogenéticamente cercanas, Jose et al., (2016) en *Pandanus spp* consiguen resultados similares a lo obtenido en medio semisólido, reportando 16 brotes con una longitud de 0,66 cm, al usar medio MS suplementado con 1.5 mg L^{-1} de BAP y 0.5 mg L^{-1} de ANA (biorreguladores y concentraciones usadas en esta investigación).

Figura 4-26: Brotes de *C. palmata* regenerados en tres sistemas de cultivo



Explantos evidenciando proliferación de brotes a los 60 días de cultivo. **A:** medio líquido con inmersión parcial, **B:** medio semisólido y **C:** medio líquido con inmersión temporal de 3 min, con 200 mL de medio, 10 explantes y frecuencia de 12 h.

4.10.2 Longitud del brote

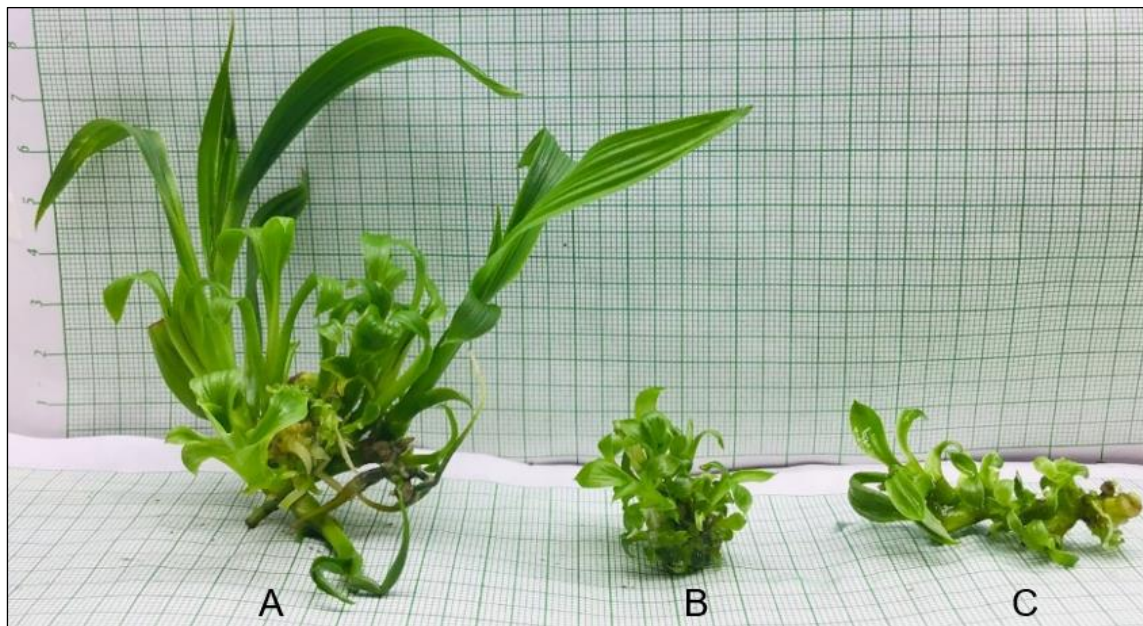
Los promedios registrados para la variable de respuesta longitud de brotes fueron sometidos a una transformación logarítmica $\log(x+1)$, debido a que los datos no cumplieron con el supuesto de homogeneidad (Prueba de Levene). El Análisis de Varianza (ANOVA) (Anexo G) evidenció que la longitud del brote difiere en al menos dos tratamientos ($p = <2e-16$). Se utilizó la prueba de Tukey al 5 % para la comparación de medias detectando 3 rangos de significancia (Anexo H).

La mayor longitud de brotes mostró el sistema BIT con inmersión de 1 y 3 min, no encontrando diferencias significativas entre tiempos de inmersión, con promedios de 2,61 y 2,03 cm respectivamente, pero superaron significativamente a la técnica de cultivo semisólido y líquido que evidenciaron las menores longitudes de brote 0,72 y 0,61 cm correspondientemente (Figura 4-31-B). Lo que permite concluir que el medio líquido es el método menos adecuado para el desarrollo de los brotes de *C. palmata* (Figura 4-27).

Concordante con los resultados aquí expuestos, Chávez et al., (2018) y Vives et al., (2017) al evaluar diferentes sistemas de micropropagación, medio semisólido, líquido y el sistema de inmersión temporal (BIT) en la micropropagación de *Gladiolus* sp y *S. rebaudiana* indican que la mejor técnica de multiplicación *in vitro* es el sistema BIT. De igual manera, Kim et al., (2020) en la micropropagación de plántulas de manzano libres de virus, evidencian brotes más largos en el sistema BIT, aproximadamente dos veces más largos que en el cultivo semisólido y cultivo líquido. De igual manera, Gómez et al., (2016) consiguen un mayor desarrollo de brotes de palma aceitera al utilizar un sistema BIT (24,4%) en comparación con el medio semisólido (6%).

En concordancia con lo anotado, se cree que la eficacia del sistema BIT se debe a que combina las ventajas del medio líquido y los períodos secos que maximiza el intercambio de gases y aumentan la absorción de nutrientes (Hwang et al., 2022), estas dos características no suelen combinarse en otros procedimientos de cultivo líquidos y semisólidos. El material vegetal en condiciones *in vitro* absorbe nutrientes no solo a través de las raíces sino también a través de las hojas. En este contexto, el sistema BIT al permitir un contacto directo del medio de cultivo con toda la superficie de los explantes, permite una mayor absorción de los reguladores de crecimiento y nutrición mineral por capilaridad, ya que se ha observado que una fina película de medio permanece en la epidermis de los explantes durante cada ciclo de inmersión (Etienne y Berthouly, 2002; Martínez et al., 2019). Además se cree que los cultivos semisólidos y líquidos tienen un crecimiento deficiente porque no hay intercambio de gases dentro del recipiente de cultivo (Hwang et al., 2022).

Figura 4-27: Diferencias en longitudes de brotes de *C. palmata* obtenidos en tres sistemas de cultivo *in vitro*



A: brotes generados en el SITA con 3 min de inmersión en 200 mL de medio de cultivo, 10 explantes por biorreactor y frecuencia 12 h. **B:** Brotes obtenidos en sistema de cultivo semisólido. **C:** brotes obtenidos en medio de cultivo liquido con inmersión parcial. Longitudes obtenidas a los 60 días de cultivo.

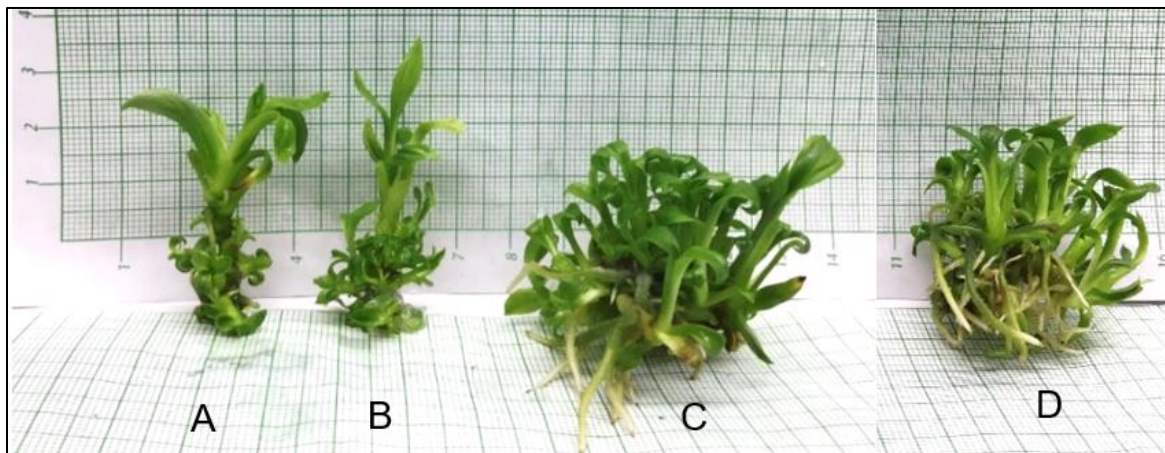
4.10.3 Número de raíces

Los promedios registrados para la variable de respuesta número de raíces cumplió los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas de acuerdo con la prueba Shapiro-Wilk ($p = 0,7749$) y Levene ($p = 0,119$). El Análisis de Varianza (ANOVA) (Anexo G), evidenció que el número de raíces por explante difiere en al menos dos tratamientos ($p = 3,71e-14$). Se utilizó la prueba de Tukey al 5 % para la comparación de medias determinando 4 grupos (Anexo H).

El sistema BIT con inmersión de 1 min presentó el mejor promedio 12,5 raíces/explante, seguido del sistema BIT con inmersión de 3 min con 7,60 raíces/explante y medio semisólido 5,23 raíces/explante. El tratamiento que menos número de raíces presentó fue el medio liquido con 4,18 raíces por explante (Figura 4-31-C).

Resultados similares a nuestro estudio registran Hwang et al., (2022) quienes consiguieron un mayor número de raíces en plántulas producidas en un SIT en comparación con medio semisólido y líquido, en la micropropagación de crisantemo (*C. morifolium*), fresas (*Fragaria* × *ananassa*) y *C. officinale*. Así también, Chávez et al., (2018) obtuvieron un mayor número de raíces por explante de *Gladiolus* sp al utilizar un sistema BIT en comparación con los dos métodos de cultivo *in vitro*, medio semisólido y medio líquido con inmersión parcial del explante. De igual manera, Silva et al., (2018) observaron un mayor número de raíces en el sistema BIT en comparación con medio de cultivo semisólido, concluyendo que BIT es una técnica eficiente para el enraizamiento de explantes de fresa cv. Pircinque. Por lo tanto, la aireación forzada del sistema BIT, el tiempo y frecuencia de inmersión de los explantes en el medio líquido se consideraron factores importantes para promover el desarrollo del sistema radical en varias especies (Figura 4-28).

Figura 4-28: Influencia del sistema de cultivo *in vitro* en la inducción de raíces de *C. palmata*



A: raíces generadas en medio de cultivo líquido con inmersión parcial. **B:** medio semisólido. **C:** SITA con inmersión temporal de 3 min en 10 mL de medio de cultivo, 10 explantes y frecuencia 12 h. **D:** SITA con inmersión de 1 min, en 10 mL de medio de cultivo, 10 explantes por biorreactor y frecuencia de inmersión de 12 h. A los 60 días de cultivo.

4.10.4 Longitud de las raíces

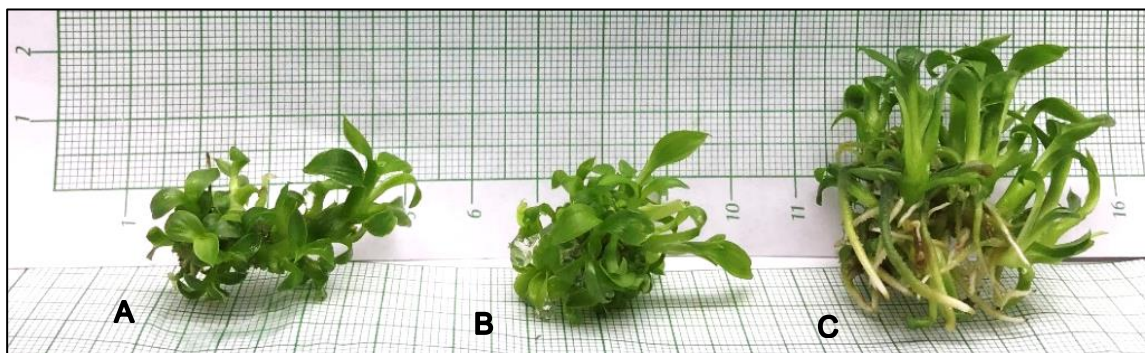
Los promedios registrados para la variable de respuesta longitud de raíces cumplió los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas de acuerdo con la prueba Shapiro-Wilk ($p = 0.1103$) y Levene ($p = 0.0144$). El Análisis de Varianza (ANOVA) (Anexo G), evidenció que la longitud de la raíz difiere en al menos dos tratamientos ($p = <1.72e-14$).

Se utilizó la prueba de Tukey al 5 % para el procedimiento de comparación múltiple, donde se detectó 4 rangos (Anexo H).

El sistema BIT con inmersión de 3 y 1 min presentó el mejor desarrollo de raíces, con un promedio de 1,44 y 1,11 cm respectivamente, seguido del tratamiento medio semisólido que alcanzó una longitud de 0,62 cm y finalmente el medio líquido que mostró la menor longitud de raíces con 0,52 cm (Fig. 4-31-D). Resultados similares reportan Silva et al., (2018) al evaluar la eficiencia del sistema de inmersión temporal BIT y el medio de cultivo semisólido en la micropropagación de fresa cv. Pircinque, reportando que el sistema BIT es una técnica eficaz para inducir un mayor desarrollo del sistema radical, en comparación con el medio semisólido (Figura 4-29).

En contradicción con nuestros resultados Chávez et al., (2018) obtuvieron una mayor longitud de raíces en medio semisólido (74,95 mm), seguido del biorreactor BIT con inmersión de 3 min (40,0) y finalmente el medio líquido que no generó raíces en *Gladiolus spp.* Así también, Mancilla et al., (2021), consiguen raíces más largas en medio semisólido, en comparación con tres sistemas de inmersión temporal evaluados, que generan los promedios más bajos para la variable longitud de la raíz.

Figura 4-29: Influencia de tres sistemas de cultivo *in vitro* en el desarrollo del sistema radical en *C. palmata*.



A: medio líquido con inmersión parcial, **B:** medio semisólido. **C:** SITA con inmersión de 1 min en 10 mL de medio de cultivo con 10 explantes y frecuencia de inmersión de 12 h. Después de 60 días de micropropagación.

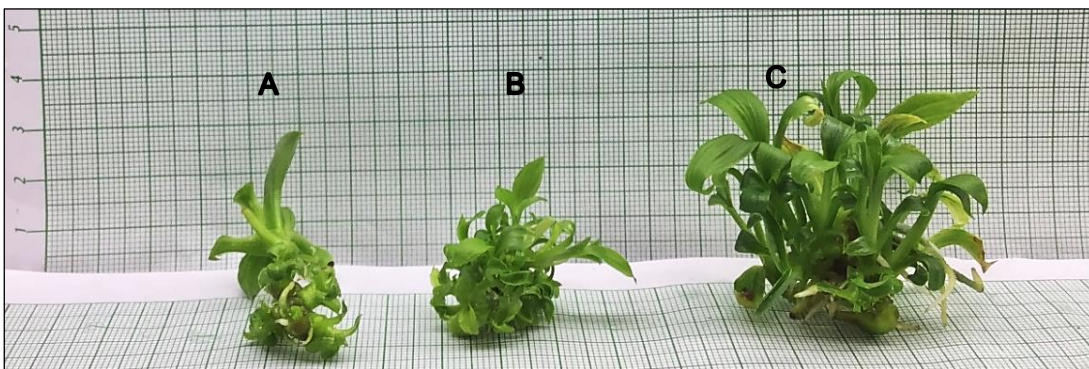
4.10.5 Número de hojas

Los promedios registrados para la variable de respuesta número de hojas por explante cumplió los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza de acuerdo con la prueba Shapiro-Wilk ($p = 0.784$) y Levene ($p = 0,2304$). El Análisis de Varianza (ANOVA) (Anexo G), evidenció que el número de hojas por explante muestran diferencias en al menos dos tratamientos ($p = < 2e-16$). Para el procedimiento de comparación múltiple se utilizó la prueba de Tukey al 5 %, donde se evidenció 3 grupos que difieren entre sí (Anexo H).

El mayor número de hojas por brote se obtuvo con el sistema BIT con 3 y 1 min de inmersión, con un promedio de 3,63 y 2,91 hojas por brote respectivamente, seguido del medio de cultivo semisólido y líquido que no difirieron estadísticamente, alcanzando un promedio de 1,77 y 1,71 hojas subsecuentemente (Figura 4-30 y 4-31-E). Resultados similares son reportados por Martínez et al., (2019) en *A. andreanum* quienes consiguen un mayor número de hojas en un SIT (4,25 hojas), seguido de inmersión parcial y medio semisólido que no difieren estadísticamente, con un promedio de 2,37 y 3,00 hojas. De igual manera, Arano et al., (2020) y Aka et al., (2020) registran que el sistema BIT incrementa el número de hojas de *C. esculenta* y *M. communis*, al comparar con el medio de cultivo semisólido.

Contrariamente, Monja et al., (2021) en *A. angustifolia* y Ramos et al., (2014) en *V. planifolia* no encuentran diferencias significativas entre los sistemas de micropropagación evaluados (SIT, inmersión parcial y medio semisólido) para la variable número de hojas.

Figura 4-30: Influencia de tres métodos de micropropagación en el número de hojas de *C. palmata* a los 60 días después de la siembra



A: medio de líquido con inmersión parcial, **B:** medio semisólido, **C:** SITA con 1 min de inmersión, con 10 mL de medio de cultivo por explante y frecuencia de 12 h.

4.10.6 Peso seco del cultivo

A los datos registrados para la variable peso seco se aplicó una transformación de potencia Box y Cox con un lambda de 95 %, debido a que los datos no presentaron normalidad de acuerdo con la prueba Shapiro-Wilk. El Análisis de Varianza (ANOVA) (Anexo G) demostró que la biomasa difería en al menos dos métodos de micropropagación ($p = < 2e-16$). Se utilizó la prueba de Tukey al 5 %, para la comparación de medias detectando 3 rangos de significancia (Anexo H).

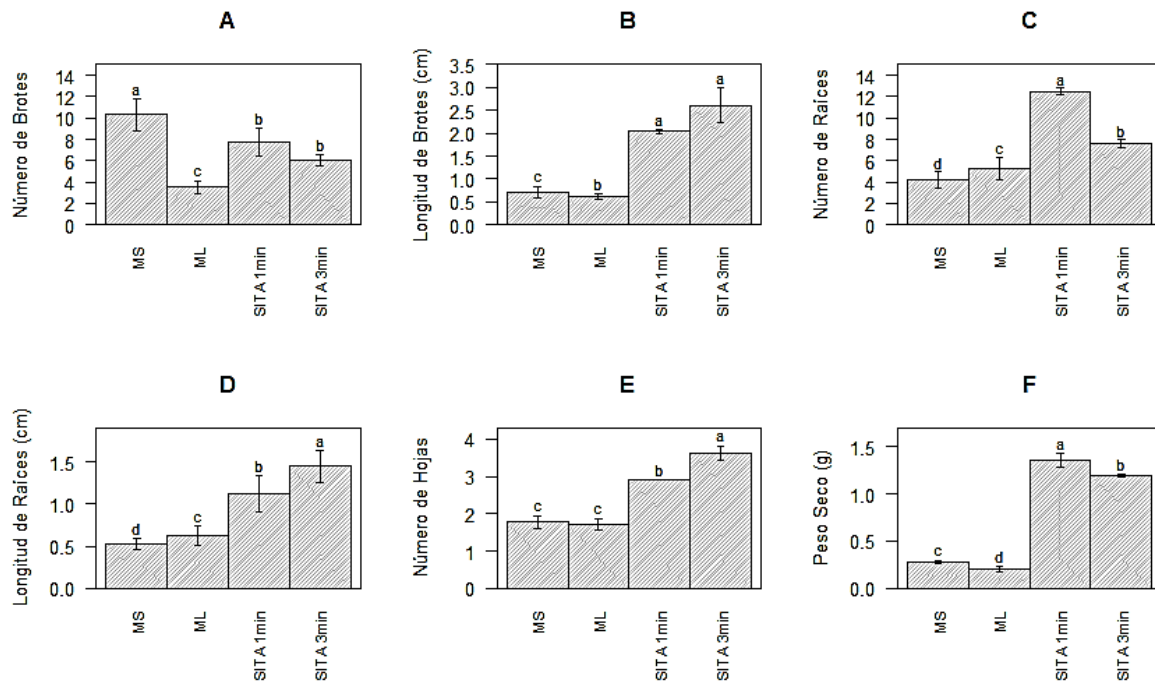
El sistema BIT con 1 min de inmersión presentó la mayor cantidad de biomasa del cultivo con un peso seco de 1,36 g, seguidos del tratamiento con inmersión de 3 min con 1,19 g demostrando que el tiempo de inmersión influye significativamente en el crecimiento y desarrollo de material vegetal micropropagado. Los promedios más bajos de biomasa fueron con medio semisólido con 0,27 g y medio de cultivo líquido con 0,20 g demostrando que estos sistemas de cultivo no son los más adecuados para la multiplicación a gran escala de *C. palmata* (Figura 4-31-F).

Estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura científica, aunque en otras especies. Tal es el caso, de la palma aceitera Gómez et al., (2016) reporta que el sistema de inmersión temporal (BIT) incrementa la biomasa del cultivo, esto al comparar con el sistema RITA y el medio de cultivo semisólido. De igual manera Vives et al., (2017) en *S. rebaudiana* reportan que el peso seco de los brotes es siete veces mayor en el sistema BIT en comparación con el medio de cultivo líquido y semisólido.

En comparación con los métodos de cultivo semisólidos y medios líquidos, el sistema BIT ofrece beneficios tecnológicos, cuantitativos y cualitativos, como mayores tasas de proliferación y desarrollo del material vegetal micropropagado (Chávez et al., 2018). Una de las principales ventajas que tiene este sistema es la renovación completa de la atmósfera del cultivo, al promover la ventilación y eliminación del etileno (San José, y otros, 2020) al momento de forzar la aireación lo que reabastece el dióxido de carbono requerido para la fotosíntesis (Hwang et al., 2022).

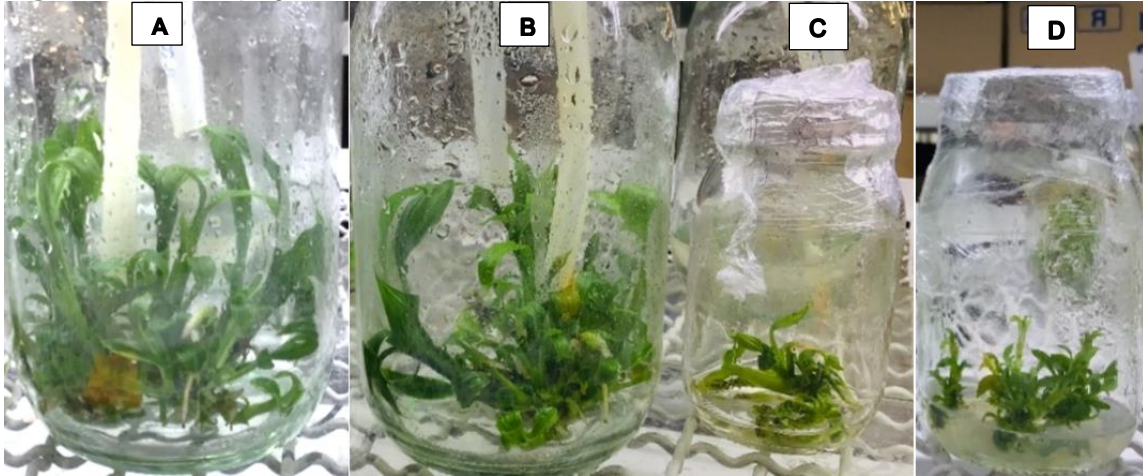
Existen estudios donde mencionan que las plántulas *in vitro* presentan estomas parcialmente funcionales, sin embargo, se ha registrado que el material vegetal producido en un SIT tiene una mayor funcionalidad de estomas, cualidad que adquiere debido a situaciones cambiantes a la que se ve sometido dentro del biorreactor (Uma et al., 2021). La condición anterior, permitiría mayor eficiencia en la producción de fotosintatos, esto explicaría la mayor eficiencia del SITA respecto a la mayor cantidad de peso seco obtenido en esta investigación (Figura 4-32). El éxito del SITA no solo depende de la tasa de multiplicación, sino también de las características morfológicas y fisiológicas de las plántulas producidas mediante este sistema.

Figura 4-31: Comportamiento de las variables a tres sistemas de cultivo en la micropropagación de *C. palmata*



MS: medio de cultivo semisólido, **ML:** medio líquido en inmersión parcial, **SITA 1 min:** medio líquido en biorreactor con 1 minuto de inmersión y frecuencia de inmersión de 12 h con 200 mL de medio de cultivo y 10 explantes por biorreactor, **SITA 3 min:** medio líquido en biorreactor con 3 minutos de inmersión en los mismos niveles de los demás factores. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey 0,05). **Nota:** Las variables longitud del brote y peso seco presentan valores medios sin transformar y las letras de significancias se obtuvo de datos transformados.

Figura 4-32: Propagación de *C. palmata* en tres sistemas de cultivo *in vitro*



A: SITA con inmersión de 1 min, en 200 mL de medio de cultivo, 5 explantes por biorreactor y frecuencia 12 h. **B:** SITA con inmersión de 3 min, con 5 explantes por biorreactor, con 200 mL de medio y frecuencia de 12 horas. **C:** sistema de cultivo líquido con inmersión parcial. **D:** sistema de medio semisólido. A los 60 días de cultivo.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Luego de finalizada la presente tesis se puede concluir que:

- Se desarrolló un sistema de inmersión temporal tipo BIT rentable, funcional y automatizado conformado por 52 biorreactores de 1 L de capacidad y se estandarizó un método de micropropagación exitosa de *C. palmata*.
- El programa de automatización del sistema BIT se realizó mediante un circuito temporizador que controló los mecanismos de electroválvulas y compresor de aire, utilizando dos PLC de la serie LOGO de SIEMENS. Además, se desarrolló un portal de acceso web que facilitó su programación y monitoreo en tiempo real, desde cualquier teléfono inteligente o computador dentro de la universidad.
- Los resultados de esta investigación han demostrado que el biorreactor BIT es un sistema eficiente para la propagación masiva de *C. palmata* en comparación con los sistemas convencionales de micropropagación, como el cultivo semisólido y líquido estático. El medio de cultivo líquido estático fue el tratamiento menos adecuado para la multiplicación *in vitro* de *C. palmata*.
- El tiempo de inmersión de 5 min favoreció al incremento del número de brotes por explante de *C. palmata*, sin embargo, este periodo no fue adecuado para conseguir un buen crecimiento y desarrollo de las nuevas plántulas.
- La inmersión de los explantes en el medio de cultivo de 1 o 3 min fue la condición idónea para obtener un mayor crecimiento del material vegetal micropropagado. Destacándose, el tiempo de inmersión de 1 min para generar un adecuado desarrollo del sistema radical y la parte aérea de los brotes, lo que se tradujo en una mayor cantidad de biomasa del cultivo.
- Un volumen de 20 mL de medio de cultivo por explante (200 mL por biorreactor) fue la condición óptima para conseguir una mayor tasa de proliferación, desarrollo de brotes

e incremento de biomasa. En cambio, un volumen de 10 mL por explante mostró ser el más adecuado para un buen desarrollo del sistema radical. Por otro lado, un volumen de 5 mL por explante fue ineficiente en la micropropagación de *C. palmata*.

- Un intervalo de inmersión de los explantes en el medio de cultivo de 6 h fue la condición más adecuada para incrementar la proliferación de brotes y raíces de *C. palmata*.
- La frecuencia de inmersión de 12 h fue la condición ideal para inducir el crecimiento y desarrollo tanto de la parte aérea y radical con el consecuente incremento de biomasa.
- La densidad de explantes utilizadas en esta investigación (5 y 10 explantes/biorreactor) no fue significativo para las variables número, longitud y hojas por explante. Esto indica, que se podría incrementar el número de explantes por contenedor sin tener efectos negativos en la morfología y fisiología del material vegetal micropropagado, además de optimizar recursos.
- El sistema BIT presenta un amplio número de ventajas al propagar plantas de interés, ya que brinda a los explantes una mayor capacidad de absorción de nutrientes, eliminación de gases nocivos como el etileno, reabastecimiento de CO₂, mejor exposición a una fuente de luz y facilita la ventilación lo que permite controlar la hiperhidricidad de tejidos.

5.2 Recomendaciones

- Diseñar y programar un registrador de datos (data loggers) utilizando la plataforma Logo SoftComfort del controlador del PLC que permita almacenar datos de algunas variables como, niveles de CO² dentro del biorreactor, temperatura y humedad relativa del proceso de micropropagación.
- Evaluar los niveles óptimos de los factores obtenidos con el módulo de optimización de múltiples respuestas con el fin de tomar la mejor decisión para la micropropagación a gran escala de *C. palmata* mediante un biorreactor de inmersión temporal.

C. Anexo: Análisis de varianza para la variables de respuesta número de raíces por explante

Los datos registrados para la variable de respuesta número de raíces presentó una distribución normal de acuerdo con la prueba Shapiro-Wilk ($p = 0.2002$).

	SC	CM	gl num	gl den	F	p-valor
Frecuencia (Fr)	54.950	54.950	1	36	26.6443	9.155e-06 ***
Tiempo (Ti)	120.892	60.446	2	36	29.3092	2.792e-08 ***
Numero de plantas (Np)	5.390	5.390	1	36	2.6136	0.1146836
Volumen (V)	54.121	27.061	2	36	13.1211	5.247e-05 ***
Fr: Ti	29.097	14.548	2	36	7.0543	0.0026004 **
Fr: Np	7.283	7.283	1	36	3.5316	0.0683233 .
Ti: NP	9.662	4.831	2	36	2.3424	0.1105727
Fr: V	16.174	8.087	2	36	3.9213	0.0287937 *
Ti: V	10.191	2.548	4	36	1.2354	0.3132485
Np: V	25.574	12.787	2	36	6.2003	0.0048544 **
Fr: Ti: Np	2.814	1.407	2	36	0.6821	0.5119510
Fr: Ti: V	19.130	4.782	4	36	2.3189	0.0756552.
Fr: Np: V	26.874	13.437	2	36	6.5155	0.0038458 **
Ti: Np: V	48.935	12.234	4	36	5.9319	0.0008985 ***
Fr: Ti: Np: V	21.140	5.285	4	36	2.5626	0.0548817 .

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

D. Anexo: Análisis de varianza para la variables de respuesta longitud de raíces

Los datos registrados para la variable de respuesta longitud de las raíces presentó una distribución normal de acuerdo con la prueba de normalidad Shapiro-Wilk (0.49).

	SC	CM	Gl num	gl den	F	p-valor
Frecuencia (Fr)	1.60140	1.60140	1	6	52.3198	0.0003543 ***
Tiempo (Ti)	0.61650	0.30825	2	6	10.0709	0.0120906 *
Número de plantas (Np)	0.59411	0.59411	1	30	19.4104	0.0001239 ***
Volumen (V)	0.35538	0.17769	2	30	5.8054	0.0073912 **
Fr: Ti	0.23653	0.11827	2	6	3.8639	0.0834915 .
Fr: Np	0.14757	0.14757	1	30	4.8214	0.0359787 *
Ti: NP	0.15403	0.07701	2	30	2.5162	0.0976758 .
Fr: V	0.32080	0.16040	2	30	5.2404	0.0111703 *
Ti: V	0.52257	0.13064	4	30	4.2682	0.0074845 **
Np: V	0.52922	0.26461	2	30	8.6451	0.0010845 **
Fr: Ti: Np	0.08360	0.04180	2	30	1.3657	0.2706127
Fr: Ti: V	0.33532	0.08383	4	30	2.7388	0.0470119 *
Fr: Np: V	0.04500	0.02250	2	30	0.7351	0.4878737
Ti: Np: V	0.21733	0.05433	4	30	1.7751	0.1599249
Fr: Ti: Np: V	0.31231	0.07808	4	30	2.5509	0.0595271 .

Códigos de significancia: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

G. Anexo: Análisis de varianza para seis variables de respuesta en la micropropagación de *C. palmata* utilizando tres sistemas de cultivo *in vitro*

Variabes		gl	SC	CM	F	p-valor
Número de brotes	Bloques	3	19,4	6,64	7,406	0,000526***
	Tratamientos	3	464,2	154,73	177,449	<2e-16 ***
	Residuales	37	32,3	0,87		
Longitud de brotes	Bloques	3	0,313	0,1043	6,696	0,00101 **
	Tratamientos	3	5,889	1,9629	126,010	< 2e-16 ***
	Residuales	37	0,576	0,0156		
Numero de raíces	Bloques	3	2,25	0,75	0,948	0,427
	Tratamientos	3	139,94	46,65	58,866	3,71e-14 ***
	Residuales	37	29,32	0,79		
Longitud de raíces	Bloques	3	0,3443	0,1148	12,08	1,17e-05 ***
	Tratamientos	3	1,7652	0,5884	61,92	1,72e-14 ***
	Residuales	37	0,3516	0,0095		
Número de hojas	Bloques	3	1,379	0,4598	19,61	8,91e-08 ***
	Tratamientos	3	8,007	2,6690	113,82	< 2e-16 ***
	Residuales	37	0,868	0,0234		
Peso seco	Bloques	3	0,268	0,0894	129,1	<2e-16 ***
	Tratamientos	3	3,486	1,1620	1676,8	<2e-16 ***
	Residuales	37	0,026	0,0007		

H. Anexo: Características de brotes de *C. palmata* en tres sistemas de cultivo *in vitro*

Tratamientos	Número de brotes	Longitud brote	Número de raíces	Longitud de raíces	Número de hojas	Peso seco
SITA 1 min	7,75 b	0,7097125 a	12,50 a	1.1157917 b	2.911607 b	1.3410288 a
SITA 3min	6,05 b	0,9540406 a	7,60 b	1.4473492 a	3.630480 a	1.1868027 b
MS	10,29 a	-0,3408810 b	5,23 c	0.6211690 c	1.773732 c	0.2935176 c
ML	3,50 c	-0,4922720 c	4,18 d	0.5231111 d	1.713000 c	0.2228108 d

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). SITA 1min: medio líquido en biorreactor con 1 minuto de inmersión, SITA 3min: medio líquido en biorreactor con 3 minutos de inmersión con frecuencia de inmersión de 12 h respectivamente, MS: medio semisólido, ML: medio líquido en inmersión parcial.

Referencias

- Abadie, A., Acevedo, M., Kugler, M., & Vargas, J. (2015). Effectiveness and Unintended Consequences of a Large Illicit Crops Eradication Program in Colombia. *Inside the War on Drugs*, 1-38.
- Ahmadian, M., Babaei, A., Shokri, S., & Hessami, S. (2017). Micropropagation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in liquid medium by temporary immersion bioreactor in comparison with solid culture. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 309-315. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.07.005>.
- Aka, Y., Bicen, B., Simsek, O., Donmez, D., & Erol, M. (2020). Evaluation and comparison of a new type of Temporary immersion system (TIS) bioreactor for myrtle (*Myrtus communis* L.). *Applied Ecology and Environmental Research*. doi:http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1801_16111620.
- Alamilla, J., Caamal, J., Criollo, M., Vera, J., & Reyes, J. (2019). Biofactory and temporary immersion bioreactor: In vitro propagation of *Anthurium andreanum* L., and economic viability. *Agro productividad*, 23-29.
- Albarracín, C. (Abril de 2012). Evaluación de la eficiencia de un Sistema de Inmersión Temporal frente al método convencional en la propagación in vitro de cilantro Cimarrón (*Eryngium foetidum*) a partir de hojas, yemas y segmentos nodales. *Tesis previo a la obtención del Título de Ingeniera en Biotecnología*. Quito, Sangolquí, Ecuador: Escuela Politécnica del Ejército.
- Alberto, J., Gracia, N., Jifon, J., Creste, S., & Kiran, K. (2020). Use of bioreactors for large-scale multiplication of sugarcane (*Saccharum spp.*), energy cane (*Saccharum spp.*), and related species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. doi:10.1007/s11627-019-10046-y.
- Álvarez, L. (2014). Plantas promisorias de uso alimenticio del Darién, Caribe Colombiano. *Boletín de Antropología*, 41-64.
- Alvarenga, S., & Salazar, T. (2015). Mass micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni in temporary immersion systems. *Cultivos Tropicales*, 50-57.
- Álvarez, L. (2014). Plantas promisorias de uso alimenticio del Darién, Caribe Colombiano. *Boletín de Antropología*, 41-64.
- Arano, S., Gómez, F., Mancilla, E., Sánchez, R., & Bello, J. (2020). An efficient protocol for commercial micropropagation of malanga (*Colocasia esculenta* L. Schott) using temporary immersion. *Scientia Horticulturae*, 1-6.
- Arredondo, C. (febrero de 2019). Diseño y Automatización de un nuevo Biorreactor para sistemas de inmersión temporal. *Tesis para la Obtener el grado de maestro en ciencias de la Computación*. Texcoco, México.
- Arteaga, C., & Orozco, M. (09 de 10 de 2015). Viabilidad financiera para la creación de la fundación PROARTICO para los artesanos del municipio de Usiacurí. *Trabajo de Profesional en finanzas y relaciones internacionales*. Barranquilla, Colombia: Universidad de la costa C.U.C. Facultad de Ciencias Económicas.
- Bello, J., Schettino, S., Ortega, J., & Spinoso, J. (2021). A temporary immersion system for mass micropropagation of pitahaya (*Hylocereus undatus*). *3 Biotech*, 11:437. doi:<https://doi.org/10.1007/s13205-021-02984-5>.

- Bennett, B., Alarcon, R., & Ceron, C. (1992). The ethnobotany of *Carludovica palmata* Ruiz & Pavon (Cyclanthaceae) n Amazonian Ecuador. *Economic Botany*, 233-240.
- Berthouly, M., & Etienne, H. (2005). Temporary immersion system: A new concept for use liquid medium in mass propagation. En *sistemas de cultivo líquido para la propagación de plantas in vitro* (págs. 165-195). doi:10.1007/1-4020-3200-5-11.
- Bulbarela, J., Gómez, F., Galindo, M., Solano, L., Murguía, J., Pastelín, M., Castañeda, O. (2019). The in vitro propagation system of *Citrus x latifolia* (Yu. Tanaka) Yu. Tanaka (Rutaceae) affects the growth and depletion of nutriments. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 290–295. doi:10.1007/s11627-019-09976-4.
- Calvache, C., & Freire, J. (2019). 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*. Ecuador: Universidad de Las Américas.
- Chávez, J., Andrade, M., Juárez, P., Villegas, O., Sotelo, H., & Perdomo, F. (2018). Evaluation of three *in vitro* culture systems for multiplication of *Gladiolus microcorms*. *Rev. Fitotec. Mex*, 551 - 554.
- Checa, L., & Ortiz, L. (06 de 2014). Contribución de la actividad artesanal de elaboración de artículos de paja toquilla a la economía de las mujeres campesinas del Municipio de Ancuya 2010 - 2011. *Informe final de Trabajo de Grado*. San Juan de Pasto, Colombia: Universidad de Nariño, San Juan de Pasto.
- Contreras, F. (14 de noviembre de 2016). Desarrollo de métodos de propagación in vitro del alcaparro (*Capparis* spp.). *Para obtener el grado de Maestro en ciencias en Biotecnología Vegetal*. Aguascalientes: Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Córdoba, F., & Portilla, J. (2005). *Orientaciones para el cultivo de la palma de iraca*. Nariño: Artesanías de Colombia.
- Corvacho, W. (2019). Diseño e implementación de un sistema de Inmersión Temporal Automatizado Para cultivos de arándano y piña en los laboratorios de nutriarandanos S.A.C. *Para optar el Título Profesional de Ingeniero Mecatrónico*. Lima, Perú.
- Debnath, S. (2016). Temporary immersion and stationary bioreactors for mass propagation of true-to-type highbush, half-high, and hybrid blueberries (*Vaccinium* spp.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. doi:10.1080/14620316.2016.1224606.
- Ekmekçigil, M., Bayraktar, M., Akkuş, Ö., & Gürel, A. (2019). High-frequency protocorm-like bodies and shoot regeneration through a combination of thin cell layer and RITA® temporary immersion bioreactor in *Cattleya forbesii* Lindl. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 451-464. doi:https://doi.org/10.1007/s11240-018-1526-2.
- Espinosa, O., Arellano, G., & Diego, H. (2017). Automation of a temporary immersion technique based on open platforms of hardware and software. *Terra Latinoamericana*, 269-277.
- Etienne, H., & Berthouly, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 215-231. doi:10.1023/A:1015668610465.
- Jose, B., Harikumar, K., Krishnan, P., & Sathe, K. (2016). In vitro mass multiplication of screw pines (*Pandanus* spp.) - an important costal bio- resource. *J Coast Conserv*, 20, 443–453. doi:https://doi-org.ezproxy.unal.edu.co/10.1007/s11852-016-0458-4
- Galan, V., Rangel, A., Lopez, J., Perez, J., Sandoval, J., & Souza, H. (2018). Propagación del banano: técnicas tradicionales, nuevas tecnologías e innovaciones. *Rev. Bras. Frutic*, (e-574).

- Galindo, L. (mayo de 2001). Elaboracion e implementacion de un plan de manejo sostenible de la Iraca (*Carludovica palmata*) como materia prima utilizada en la producción artesanal en Usiacurí, Atlantico. *El Cultivo de la Palma de Iraca en el Municipio de Usiacurí y otras regiones*. Barranquilla, Colombia: Fundación Mario Santodomingo.
- Galviz, A., Ochoa, A., Arias, M., Ochoa, S., & Osorio, F. (2019). Valorization of iraca (*Carludovica palmata*, Ruiz and Pav.) infructescence by ultrasound-assisted extraction: An economic evaluation. *Journal Pre-proof*, 1-32.
- Galviz, A., Ochoa, A., Arias, M., Ochoa, S., & Osorio, F. (2021). Obtaining phenolic compounds from iraca waste (*Carludovica palmata* Ruiz & Pav) through ultrasound-assisted extraction. *Biomass Conversion and Biorefinery*. doi:https://doi.org/10.1007/s13399-021-01490-1.
- Gao, M., Jiang, W., Wei, S., Lin, Z., Cai, B., Yang, L., Chen, L. (2015). High-efficiency propagation of Chinese water chestnut [*Eleocharis dulcis* (Burm.f.) Trin. ex Hensch] using a temporary immersion bioreactor system. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. doi:10.1007/s11240-015-0732-4.
- Garcés, M., Senés, C., Declerck, S., & Cranenbrouck, S. (2017). Arbuscular Mycorrhizal Fungal Community Composition in *Carludovica palmata*, *Costus scaber* and *Euterpe precatoria* from Weathered Oil Ponds in the Ecuadorian Amazon. *Front Microbiol*. doi:10.3389/fmicb.2017.02134.
- Gatica, A., & Weber, G. (2013). Genetic transformation of hop (*Humulus lupulus* L. cv. Tettnanger) by particle bombardment and plant regeneration using a temporary immersion system. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant*, 656–664. doi:DOI 10.1007/s11627-013-9574-0.
- Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A., & Bley, T. (2014). Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Eng. Life Sci*, 607-621.
- Gómez, H., Cunha, P., Balzón, T., & Scherwinski, J. (2016). Regeneration of somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis*) using temporary immersion bioreactors. *Industrial Crops and Products*, 89(30), 244-249. doi:https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.05.021
- Gómez, T., Sanchez, A., & Rivera, L. (2011). El manejo de Semilla de *Carludovica* (Palma Jipi) para la Producción de Plantas. *VI Reunión Nacional de Innovación Forestal.*, (pág. 44). León, Guanajuato.
- González, S., Lozano, J., & Rojas, M. (2004). *Propagación asexual de plantas*. Colombia: Corpoica.
- Graca, M., Lombardi, J., Forzza, R., & Rudall, P. (2014). Comparative anatomy of reproductive structures in Cyclanthaceae (Pandanales). *International Journal of Plant Sciences*, 814–827.
- Guillermo, I., Angarita, A., & Mosquera, T. (2003). Induction of somatic embryogenesis in *Alstroemeria* spp. *Agronomía Colombiana*, 121-128.
- Harlyng, G., Wilder, G., & Eriksson, R. (1998). Cyclanthaceae, *The Families and Genera of Vascular Plants* (págs. 202–215).
- Hoyos, R., & Chicaíza, D. (2019). In vitro Multiplication of Iraca palm (*Carludovica palmata* Ruiz & Pavón). *Facultad Nacional de Agronomía*. doi: 10.15446/rfnam.v73n1.80139
- Hwang, H.-D., Kwon, S.-H., Murthy, H., Yun, S.-W., Pyo, S.-S., & Park, S.-Y. (2022). Temporary immersion bioreactor system as an efficient method for mass production of *in vitro* Plants in Horticulture and Medicinal Plants. *Agronomy*. doi:https://doi.org/10.3390/agronomy12020346.
- Khan, M., Rozhon, W., & Poppenberger, B. (2014). The Role of Hormones in the Aging of Plants – A Mini-Review. *Gerontology*, 49-55. doi:doi: 10.1159/000354334

- Kim, N., Hwang, H., Kim, J., Kwon, B., Kim, D., & Park, S. (2020). Efficient production of virus-free apple plantlets using the temporary immersion bioreactor system. *Hortic. Environ. Biotechnol.*, 779–785. doi:https://doi.org/10.1007/s13580-020-00257-3
- Kunakhonnuruk, B., Kongbangkerd, A., & Inthima, P. (2019). Improving large-scale biomass and plumbagin production of *Drosera communis* A.St.-Hil. by temporary immersion system. *Industrial Crops and Products*, 197-202.
- Leyva, O., Bello, J., Murguía, J., Núñez, R., & Ramírez, M. (2020). Micropropagation of *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler et W. E. Higging in Temporary Immersion Systems. *3 Biotech*, 10-26. doi:https://doi.org/10.1007/s13205-019-2010-3.
- Llámez, Y. (2009). Sistema de Automatización de Biorreactores de Inmersión Temporal. *Trabajo de Diplomado*. Santa Clara: Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas.
- Lotfi, M., Bayoudh, C., Werbro, S., & Mars, M. (2020). Effects of meta-topolin derivatives and temporary immersion on hyperhydricity and in vitro shoot proliferation in *Pyrus communis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 499-505. doi:https://doi.org/10.1007/s11240-020-01935-x.
- Mancilla, E., Pérez, J., Núñez, R., Spinoso, J., & Bello, J. (2021). Comparison of Different Semi-Automated Bioreactors for In Vitro Propagation of Taro (*Colocasia esculenta* L. Schott). *Plants*, 1-11. doi:doi.org/10.3390/plants10051010.
- Marchant, M., Molina, P., Montecinos, M., Guzmán, L., Balada, C., Fassio, C., & Castro, M. (2021). In vitro propagation of easter island curcuma longa from rhizome explants using temporary immersion system. *Agronomy*, 1-11. doi:https://doi.org/10.3390/agronomy11112121.
- Martínez, A., Ramírez, M., Mosqueda, O., Escalona, M., Rivas, M., Rodríguez, R., Bello, J. (2020). Influence of Vitrofurax on sugarcane micropropagation using temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*.
- Martínez, E., Islas, B., Pérez, & Bello, J. (2019). Temporary immersion improves in vitro multiplication and acclimatization of *Anthurium andreanum* Lind. *Scientia Horticulturae*, 185-191. doi:https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.01.053.
- Martínez, Y., Andrade, M., Colinas, M., Villegas, Ó., Castillo, A., & Alia, I. (2015). Culture media inorganic salts effect on pascuíta (*Euphorbia leucocephala* L.) growth. *Rev. fitotec. mex.*
- Miranda, D., & Flores, H. (2020). *C. palmata*. Medellín: Universidad Nacional Sede Medellín.
- Moo, V., Pérez, E., Ríos, C., Bello, L., Cervantes, J., Dzul, M., & Estrada, R. (2019). Extraction and Characterization of Natural Cellulosic Fiber From Jipijapa (*Carludovica palmata*). *Chiang Mai J. Sci.*, 43(3), 579-591.
- Monja, K., Olvera, D., Herrera, M., & Sánchez, F. (2021). Comparison of conventional and temporary immersion systems on micropropagation (multiplication phase) of *Agave angustifolia* Haw. 'Bacanora'. *3 Biotech*. doi:doi.org/10.1007/s13205-020-02604-8.
- Mosqueda, O., Escalona, M., Teixeira, J., Pina, D., & Marcos, D. (2017). In vitro propagation of *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hooker f. in a temporary immersion bioreactor. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 543-551. doi:DOI 10.1007/s11240-017-1186-7.
- Muñoz, M., & Tuberquía, D. (1999). Estudio preliminar para el manejo sostenible de *Carludovica palmata* R. y P. como materia prima en la producción de papel artesanal en Cabo Corrientes, Chocó, Colombia. *Actual Biol*, 87-97.
- Mutis, J., Galeano, G., & Bernal, R. (1985). *Flora de la Real Expedición Botánica del nuevo Reino de Granada*. Madrid: Ediciones Cultura Hispana.

- Murillo, E., Deli, J., Nagy, V., Molinar, E., Sándor, V., Marton, K., & Agócs, A. (2021). Carotenoid profile of two capsorubin-rich tropical plants. *Journal of Food Composition and Analysis*. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103798>
- Oliveira, C., Bortolotti, A., Correa, P., Azevedo, J., & Rodrigues, G. (2018). Bioreactor in the micropropagation of ornamental pineapple. *Ornam. Hortic. (Campinas)*, 182-187.
- Ortega, J. (2016). Efecto de abono orgánico e inorgánico en el crecimiento de la Palma de Jipi (*Carludovica palmata* Ruiz & Pavón) en el norte de Campeche, México. *Tesis para optar al grado de Maestro en Ciencias en Recursos Naturales y Desarrollo Rural con orientación en Gestión de Ecosistemas y Territorios*. Campeche, México: El Colegio de la Frontera Sur.
- Perea, M., Gonzáles, T., Campos, H., Guillot, G., & Cogua, J. (2009). *Cultivo de Tejidos Vegetales In Vitro*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.
- Pérez, J., Fonseca, M., Bahi, M., Silva, J., & Werbrouck, S. (2020). In vitro multiplication of *Morus alba* L. Criolla variety in temporary immersion systems. *Pastos y Forrajes*.
- Polzin, F., Sylvestre, I., Décha, E., Ilbert, P., Etienne, H., & Engelmann, F. (2014). Effect of activated charcoal on multiplication of African yam (*Dioscorea cayenensis-rotundata*) nodal segments using a temporary immersion bioreactor (RITA®). *Plant Tissue Culture*, 210–216. doi:<https://doi.org/10.1007/s11627-013-9552-6>.
- Pramita, A. D., Kristanti, A. N., Sugiharto, Wida, E., & Wulan, Y. (2018). Production of biomass and flavonoid of *Gynura procumbens* (Lour.) Merr shoots culture in temporary immersion system. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 639-643. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.05.007>.
- Quezada, A., Ochoa, A., Arias, M., Ochoa, S., & Osorio, F. (2019). Valorization of iraca (*Carludovica palmata*, Ruiz and Pav.) infructescence by ultrasound-assisted extraction: An economic evaluation. *Journal Pre-proof*, 1-30.
- Rachmi, R., Fadholi, M., Muhammad, R., & Faizal, A. (2019). Shoot multiplication and growth rates of *Aquilaria malaccensis* Lamk. shoot cultures in temporary immersion system (TIS)-RITA® and bubble column bioreactors. *Pak. J. Bot.*, 1317-1321. doi:10.30848/PJB2019-4.
- Ramírez, M., & Iglesias, L. (2016). Evaluation of different temporary immersion systems (BIT®, BIG, and RITA®) in the micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 154–160.
- Ramírez, M., Cruz, C., Cano, A., & Bello, J. (2019). Assessment of different temporary immersion systems in the micropropagation of anthurium (*Anthurium andreaeanum*). *3 Biotech*. doi:doi:10.1007/s13205-019-1833-2.
- Ramos, A., Iglesias, L., Bello, J., & Lee, H. (2014). Improved propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant*. doi:DOI 10.1007/s11627-014-9602-8.
- Regueira, M., Rial, E., Blanco, B., Bogo, B., Aldrey, A., Correa, B., Vidal, N. (2018). Micropropagation of axillary shoots of *Salix viminalis* using a temporary immersion system. *Trees*, 61-71. doi:<https://doi.org/10.1007/s00468-017-1611-x>.
- Roca, W., & Groginski, L. (1993). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones*. Calí, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Rojas, M., & Ramírez, H. (1990). *Control hormonal del desarrollo de las plantas*. México: Limusa.
- San José, M., Blázquez, N., Cernadas, M., Janeiro, L., Cuenca, B., Sánchez, C., & Vidal, N. (2020). Temporary immersion systems to improve alder micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 265-275. doi:<https://doi.org/10.1007/s11240-020-01937-9>

- Sehremmer, F. (1982). Flowering and Flower Visitors in *Carludovica palmata* (Cyclanthaceae) an Ecological Paradoxon. *Plant Systematics and Evaluation*, 95-107.
- Sharry, S., Adema, M., & Abedini, W. (2015). *Plantas de probeta. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro*. Buenos Aires, Argentina: edulp.
- Shukla, M., Piunno, K., Saxena, P., & Jones, A. (2019). Improved in vitro rooting in liquid culture using a two piece scaffold system. *EngineeringinLifeSciences*, 1-7.
- Silva, S., Rufato, L., Magro, M., & Kulkamp, A. (2018). Temporary immersion bioreactors: efficient technique for the propagation of the 'Pircinque' strawberry. *Revista Brasileira de fruticultura*. doi:<http://dx.doi.org/10.1590/0100-29452019102>
- Sólorzano, R. (2016). Diseño y construcción de un sistema de biorreactor de inmersión temporal nemática para la multiplicación de *Ananas comosus* var. Roja trujillana. *Tesis para la obtención de maestro en Ciencias mención en Biotecnología Agroindustrial y Ambiental*. Perú: Universidad Nacional de Trujillo.
- Suárez, I. (2020). *Cultivo de tejidos Vegetales*. Montería: Cultivo de Tejidos Vegetales, Fondo Editorial Universidad de Córdoba.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiología Vegetal*. España: Publicacions Universitat de Jaume I.
- The, L., Park, Y., & Jeong, B. (2019). Growth and development of carnation 'Dreambyul' plantlets in a temporary immersion system and comparisons with conventional solid culture methods. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 538-548. doi:DOI:10.1007/s11627-019-10012-8
- Tirado, A., & Perea, M. (2011). *Cultivo de tejidos vegetales in vitro*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Tuberquia, D. (2019). La belleza y la simplicidad de una planta tropical cuyos productos trascienden los tiempos acompañando el desarrollo económico de la región. *la Iraca un emblema de la etnobotánica tropical*. Colombia: Fundación conservando medio ambiente y cultura. Obtenido de <https://www.fundacionconservando.org/iraca>
- Uma, S., Karthic, R., Kalpana, S., Suthanthiram, B., & Saraswathi, M. (2021). A novel temporary immersion bioreactor system for large scale multiplication of banana (Rasthali AAB—Silk). *Scientific Reports*. doi:10.1038/s41598-021-99923-4
- Välimäki, S., Paavilainen, L., Tikkinen, M., Salonen, F., Varis, S., & Aronen, T. (2020). Production of Norway spruce embryos in a temporary immersion system (TIS). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*.
- Vega, P., Canchignia, H., González, M., & Seeger, M. (2016). Biosynthesis of indole-3-acetic acid and plant growth. *Cultivos Tropicales*, 33-39. doi:DOI: 10.13140/RG.2.1.5158.3609.
- Vidal, N., Blanco, B., & Cuenca, B. (2015). A temporary immersion system for micropropagation of axillary shoots of hybrid chestnut. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 229-243. doi:10.1007/s11240-015-0827-y.
- Vidal, N., & Sánchez, C. (2019). Use of bioreactor systems in the propagation of forest trees. *Eng Life Sci*, 896–915.
- Vilchez, J., & Albany, N. (2014). *In vitro* multiplication of *Psidium guajava* L. in temporary immersion systems. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 96-103. doi:10.15446/rev.colomb.biote.v16n2.42180.
- Villamarín, d., Oviedo, D., Evangelista, S., Sepúlveda, G., Molina, J., & Rodríguez, M. (2019). *Trichoderma asperellum*, an inoculant for the production of steviol glycosides in *Stevia*

rebaudiana Bertoni plants micropropagated in a temporary immersion bioreactor. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 1153-1161.

Vives, K., Andújar, I., Lorenzo, J., Concepción, O., Hernández, M., & Escalona, M. (2017). Comparison of different in vitro micropropagation methods of *Stevia rebaudiana* B. including temporary immersion bioreactor (BIT). *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 195–199. doi:DOI 10.1007/s11240-017-1258-8.

Zulfiqar, F., Younis, A., Abideen, Z., Francini, A., & Ferrante, A. (2019). Bioregulators can improve biomass production, photosynthetic efficiency, and ornamental quality of *Gazania rigens* L. *Agronomy*, 9-773. doi:<https://doi.org/10.3390/agronomy9110773>

