

## **Diseño de un sistema artesanal de inmersión temporal (SIT) en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Oriente**

Design of an artisanal temporary immersion system (SIT) in the Laboratory of Biotechnology of the University of Oriente

**Víctor Alejandro OTAHOLA GÓMEZ<sup>1</sup>y Juan Carlos MORANTES MAURERA<sup>2</sup>**

1/ Laboratorio de Biotecnología Núcleo Monagas de la Universidad de Oriente. Campus Universitario Juanico, Urbanización Juanico, Maturín, estado Monagas, Venezuela. Email: [votahola@gmail.com](mailto:votahola@gmail.com).

2/Departamento de Agronomía, Escuela de Ingeniería Agronómica, Núcleo de Monagas de la Universidad de Oriente. Campus Universitario Los Guaritos. Av. Universidad, Maturín, estado Monagas, Venezuela.

### **RESUMEN**

El sistema de inmersión temporal fue desarrollado en Francia y dio gran fuerza y empuje al desarrollo de los cultivos *in vitro*, este sistema fue usado primeramente en el cultivo de células animales para la década de 1960. En el área vegetal se utilizó poco después al recibir algunas adaptaciones y modificaciones, reemplazando algunas técnicas de trabajo que eran utilizadas para desarrollo de estos cultivos, luego que sale a la luz el (S.I.T) de tanque agitado, le procede una nueva versión que pertenece a la misma línea de los sistemas de inmersión temporal, pero con un funcionamiento más rendidor el S.I.T por columna de burbujeo. Este experimento fue realizado en el laboratorio de Biotecnología del Núcleo de Monagas de la Universidad de Oriente, ubicado en el campus Juanico en la ciudad de Maturín, estado Monagas, Venezuela y se formuló tomando como punto partida el funcionamiento del sistema de inmersión temporal RITA® de origen Francés utilizado para la multiplicación de material vegetal en cultivos *in vitro*, con el objetivo de diseñar y construir un modelo de sistema de inmersión temporal de manera artesanal con materiales de fácil adquisición y de costos muy bajos, para luego comparar el funcionamiento de ambos sistemas de manera simultánea y determinar la factibilidad de ser utilizado en la multiplicación masiva de vitroplantas de diferentes especies vegetales en el Laboratorio de Biotecnología. Las pruebas realizadas mostraron la eficiencia del sistema artesanal diseñado y construido y su similitud en resultados con el sistema RITA®.

**Palabras clave:** Sistema de inmersión temporal, artesanal, RITA®

### **ABSTRACT**

The temporary immersion system was developed in France and gave great force and impetus to the development of *in vitro* cultures. This system was first used in the cultivation of animal cells in the 1960s. In the plant area it was used shortly after receiving some adaptations and modifications, replacing some work techniques that were used for the development of these crops, after the stirred tank (SIT) comes to light, a new version follows that belongs to the same line of temporary immersion systems but with a more efficient operation the SIT by bubble column. This experiment was carried out in the Biotechnology laboratory of the Monagas Nucleus of the Universidad de Oriente, located on the Juanico campus in the city of Maturín, Monagas state, Venezuela and was formulated taking as a starting point the operation of the RITA® temporary immersion system. of French origin used for the multiplication of plant material in *in vitro* cultures, with the aim of designing and building a model of a temporary immersion system in an artisanal way with materials that are easily acquired and very low cost, and then compare the performance of both systems simultaneously and determine the feasibility of being used in the massive multiplication of vitroplants of different plant species in the Biotechnology Laboratory. The tests carried out showed the efficiency of the craft system designed and built and its similarity in results with the RITA® system.

**Keywords:** Temporary immersion system, artisanal, RITA®

## INTRODUCCIÓN

El nacimiento de la nueva biotecnología fue acompañado por estimaciones y predicciones muy óptimas acerca de su potencial para superar muchas barreras opuestas al continuo incremento de la productividad, así como para enfrentar problemas difíciles de atacar con tecnologías tradicionales (Jaffé, 1993). Dentro de las técnicas biotecnológicas una de las más activas ha sido el cultivo de tejidos vegetales, que consiste esencialmente en aislar una porción de la planta, denominada explante (parte separada de un vegetal, por ejemplo: protoplasto, células, tejidos, órganos) y proporcionarle, artificialmente, las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen su potencial intrínseco o inducido, manteniendo en cada una de sus fases o procedimientos, condiciones indispensables de asepsia para mantener los cultivos libres de contaminación microbiana (Roca y Mronginski 1993). Los biorreactores son parte de las nuevas tecnologías implementadas para acelerar y aumentar la eficiencia en los procesos de la propagación masiva de plantas (Ackermann *et al.*, 2003).

En la década de 1960 se cultivaron las primeras células vegetales en suspensión, para lo cual fueron utilizados varios diseños de biorreactores, a nivel de laboratorio, adaptando los ya usados para el cultivo de bacterias y células animales. (Dixon y Gonzales, 1994, Paredes, 2005). El sistema de inmersión temporal (SIT) fue inventado y desarrollado en el laboratorio BIOTROP del CIRAD- Gerdat (Montpellier, Francia.). Este método se basa en el cultivo de explantes durante tiempos muy cortos de inmersión de un medio en cultivo líquido. El resto del tiempo los explantes quedan en una atmósfera húmeda y estéril. Este sistema ya dio buenos resultados en varias especies de plantas (Alvard *et al.*, 1993; Teisson *et al.*, 1994; Escalant *et al.*, 1994).

Rosales *et al.* (2003) en su trabajo “Diseño y Construcción de un Sistema de Inmersión Temporal” describen el funcionamiento del sistema desarrollado e indica que consiste básicamente en dos recipientes de vidrio en forma cilíndrica con boca ancha de 250 mL de capacidad, cada uno de los cuales lleva un tapón de hule al que se les hacen dos orificios de 5 mm en los que se introducen dos tubos de vidrio también de 5 mm. Uno de ellos hasta el fondo del recipiente saliendo 8 cm por encima del tapón y el

otro se introduce hasta que queda al ras de la parte inferior del tapón, y sale 8 cm en la parte superior del tapón. Mediante una manguerita de plástico flexible y transparente se conectan los dos recipientes, uniendo los tubos de vidrio que se introdujeron hasta el fondo de los recipientes. Por los otros tubos de vidrio que no llegan al fondo de los recipientes se introduce aire por medio de un compresor, primero en uno y luego en el otro.

Cuando se introduce aire en el recipiente que contiene los explantes y el medio nutritivo en forma líquida la presión aumenta en el interior del recipiente haciendo que el líquido que se encuentra dentro de él suba por el tubo de vidrio y pase hacia el otro recipiente (principio de Pascal); cuando todo el líquido ha pasado al otro recipiente, se invierte el proceso, regresando el líquido al recipiente que contiene los explantes. Todo este proceso es controlado mediante dos “controladores de tiempo”, los que son programados para que realice este ciclo. En el primer evento, cuando el aire entra hace presión en el interior del recipiente y hace que el líquido pase de un recipiente a otro; la entrada del aire se realiza mediante una válvula S1 que se abre mediante un controlador de tiempo (Timer T1) permaneciendo cerrada la válvula S2 del otro recipiente mediante otro controlador de tiempo (Timer T2). En el segundo evento, cuando entra el aire en el segundo recipiente, la presión hace que el líquido regrese al primero mediante la válvula S2 que es abierta por otro controlador de tiempo T2, terminando el ciclo. La válvula S2 del primer recipiente permanece cerrada.

El sistema RITA® funciona con un solo recipiente, que contiene, en el fondo el medio líquido, y más arriba, los explantes. El aire emitido por la bomba, entra al envase mediante mangueras y pasa a través de filtros, para eliminar contaminantes. La presión de aire hace subir el medio nutritivo y se mojan los explantes por un tiempo determinado (uno a cinco minutos) y con frecuencias que pueden variar de cuatro a ocho horas. La principal ventaja del SIT es incorporar un mayor grado de automatización de los procesos de multiplicación (proliferación), elongación y enraizamiento del cultivo *in vitro*, dependiendo de la especie. En algunas especies tropicales, como plátano y piña, el SIT ha demostrado ser altamente eficiente, ya que ha permitido reducir en 30 a 40% el uso de mano de obra, reactivos, material fungible, niveles de contaminación,

manipulación de explante, y el tiempo de producción de plantas. Por otro lado, el sistema ha permitido aumentar la tasa de multiplicación, el porcentaje de enraizamiento, la sobrevivencia de plantas en la etapa de aclimatación en porcentajes que pueden variar entre un 40 y un 50%, dependiendo del tipo de cultivo y de la producción de plantas porm<sup>2</sup> instalado de laboratorio. Todo ello ha permitido una disminución de los costos de producción de hasta un 50%, en comparación con el sistema de micropropagación convencional (Paredes, 2005). Otra de las ventajas que ofrece el SIT es un mayor contacto entre la biomasa vegetal y el medio, la inexistencia de restricción en el intercambio gaseoso y la posibilidad de controlar la composición del medio, así como la de la atmósfera dentro del biorreactor (Ziv, 1995; Kulkarni *et al.*, 2007).

En general los biorreactores de columna de burbujeo son los más simples con respecto a su configuración. El diseño básico consta de un recipiente cilíndrico con una relación altura a diámetro de 3 y 10 y está equipado con un difusor de aire en el fondo. El líquido contenido en el biorreactor es mezclado debido al movimiento ascendente de las burbujas de aire, las cuales también proporcionan el oxígeno necesario para las células (Lee, 1992; Damiano *et al.*, 2003). Los regímenes de operación de una columna de burbujeo son homogéneos, heterogéneos y de transición. Estos regímenes dependen de la velocidad superficial del gas, las propiedades fisicoquímicas del sistema gas-líquido, el diseño del difusor (principalmente el diámetro de orificio) y el diámetro de columna. Tienen una amplia gama de aplicaciones en la industria química, petroquímica, y en relación ambiental, siendo preferido algunas veces sobre otro tipo de biorreactores debido a su simplicidad y bajo costo de operación, así como la buena transferencia de masa y de calor que presentan. La columna de burbujeo se usa preferentemente cuando las reacciones que se llevan a cabo son lentas y la resistencia al transporte de masa se localiza en la fase líquida (Wild *et al.*, 2003; Kulkarni *et al.*, 2007; Ochieng *et al.*, 2007)

Entre las experiencias utilizando los sistemas de inmersión temporal podemos citar entre otros el cultivo *in vitro* de la piña (Casale y De García, 1987; Sripaoraya *et al.*, 2003; Mogollón *et al.*, 2004; De García *et al.*, 2008; Saucedo *et al.*, 2008). (Sripaoraya *et al.*, 2003; Firoozabady y Gutterson, 2003; Roostika

y Mariska, 2003; Firoozabady y Moy, 2004; Amin *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2002); oculo (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott) (Vilchez, 2011); en musáceas (Colmenares y Giménez 2003; Pérez *et al.*, 2003); orquídeas del género *phalenopsis* (Tirado *et al.*, 2005).

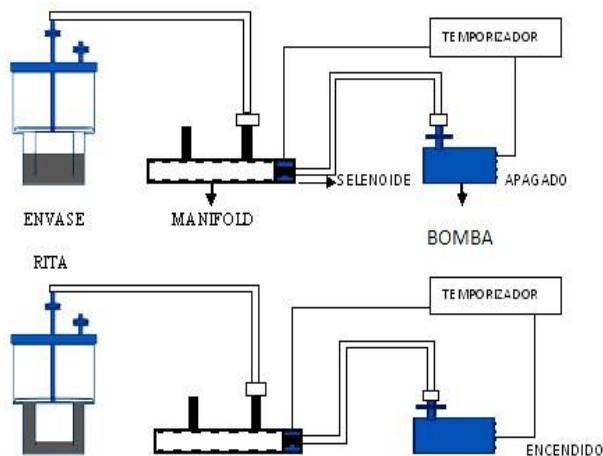
## METODOLOGÍA

Para el diseño del sistema de inmersión temporal artesanal (SIT) se utilizaron materiales locales de fácil adquisición y algunas herramientas comunes. El principio que se utilizó fue el de columna burbujeo, un poco distinto al utilizado por el RITA® (figura 1), el cual usa un sistema que produce la inmersión de los brotes por ascensión y burbujeo del medio líquido. Esto ocurre ya que el envase de este sistema RITA®, tiene un diseño interno que le permite hacerlo, el cual consiste en la entrada de aire por medio de una tubería que se une aproximadamente a la mitad del envase con un vaso invertido, reduciendo los espacios laterales que tiene que recorrer el medio para llegar al lugar donde se encuentran los brotes, produciéndose un efecto de marea. Este sistema también tiene una tubería para liberar presión que se acumula en el envase, esta se encuentra en la tapa del envase, está alimentado por una bomba de aire y es dirigido por un sistema de solenoide unida a un controlador electrónico también llamado temporizador.

El sistema artesanal fue basado en el burbujeo, que consiste en la entrada de aire por medio de una tubería principal que llega hasta el fondo, sin entrar en contacto con la parte inferior del envase, terminando esta tubería con una forma de falda metálica la que permite disipar de manera uniforme el aire que viene de la bomba, controlado por un sistema de solenoide y un controlador electrónico (temporizador), dándole también una mayor presión para producir el burbujeo que humedecería los brotes que se encuentran suspendidos a la mitad del envase sobre una bandeja, este diseño también presenta una tubería para liberar presión ubicada en tapa del envase (figura 2).

Para lograr los objetivos planteados el trabajo se realizó en varias etapas. Primero, la selección del envase; segundo el diseño y construcción de la tuberías y conexiones; tercero, el diseño y construcción del soporte para las vitroplantas; cuarto,

el ensamblaje de todas las partes y por último, la prueba de funcionamiento del sistema.



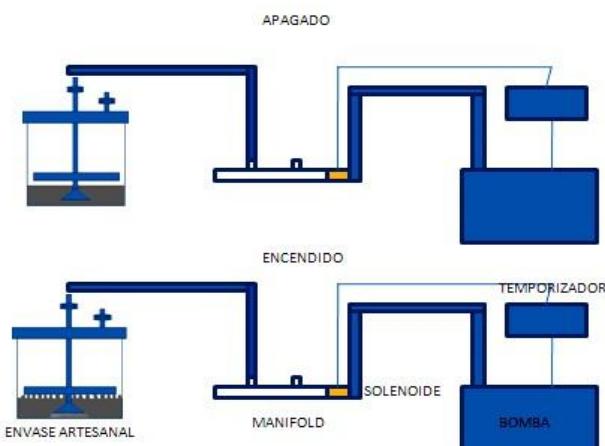
**Figura 1. Componentes del Sistema de Inmersión Temporal RITA®**

#### Selección del envase

Al seleccionar el envase fueron consideradas varias condiciones. El envase debe ser de vidrio liso por las condiciones de asepsia que se deben mantener, debe ser de vidrio que resista someterse, junto con la tapa, al proceso de esterilización en el autoclave.

Otra consideración importante es la forma del envase, la cual en lo posible debería ser de forma cilíndrica, es decir que el diámetro de la tapa sea parecido al diámetro de la base, a fin de permitir la instalación del sistema interno. Con estas premisas se manejaron algunas alternativas y no fue tan fácil obtener el envase, especialmente porque los frascos cilíndricos que se obtuvieron presentaban tapas muy débiles y no soportaban las temperaturas del autoclave. Otro aspecto importante que se consideró fue la capacidad del envase, ya que debería ser un tamaño tal que permitiera contener aproximadamente 250 mL de medio para que el sistema de burbujeo funcionara adecuadamente con la bomba de aire disponible en el laboratorio. Frascos muy pequeños limitan la cantidad de material vegetal que pueden soportar y muy grandes dificultan el funcionamiento del sistema e incrementan las posibilidades de contaminación. Después de probar con diferentes alternativas, se seleccionó un envase

utilizado para almacenar galletas, de forma redondeada, con dos caras circulares y dos caras planas, con diámetro de 82mm en la parte superior y una base de 85mm de diámetro, construido de vidrio liso, fácil de lavar, resistente, tanto el vidrio como su tapa a la esterilización en el autoclave.



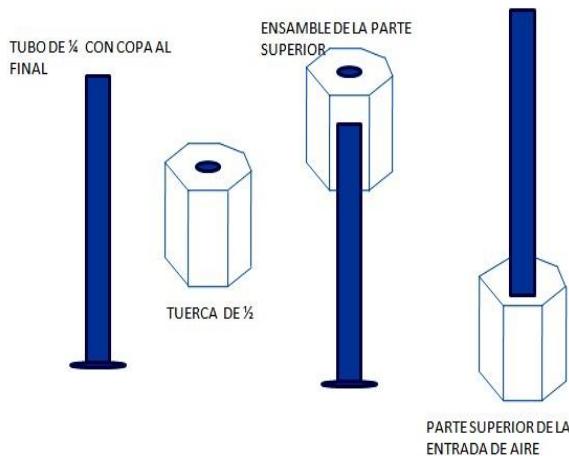
**Figura 2. Componentes del Sistema de inmersión temporal artesanal desarrollado**

#### Diseño y Construcción de tuberías y conexiones

Después que se seleccionó el envase se dio inicio al desarrollo del sistema interno dentro del frasco. La elaboración del sistema interno empezó con seleccionar el material que se utilizaría para diseñar la tubería de entrada y salida de aire. El material que se eligió fueron tubos de cobre, tomando en consideración que es un material de fácil adquisición, es un fungicida natural, es resistente al efecto oxidante del medio utilizado para el desarrollo de los brotes y presenta fácil maleabilidad para diseñar.

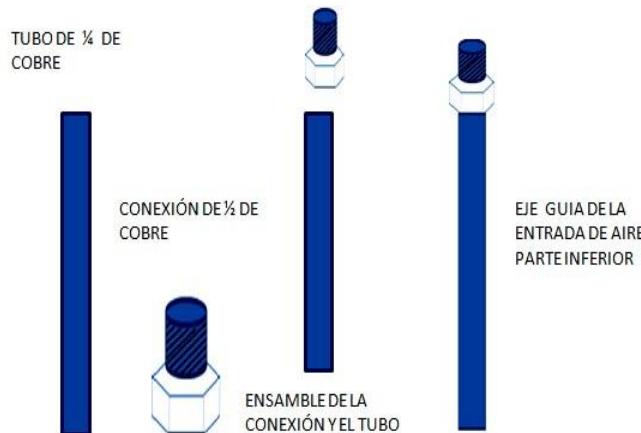
La entrada de aire al envase se realizó con tubería de cobre de  $\frac{1}{4}$  de pulgada compuesta en dos partes, una parte que va fija a la tapa del envase y la segunda parte donde va fijada la bandeja para sostener los brotes, ambas partes se unen por medio de una conexión fácil de enroscarde cobre. La parte superior de la tubería de entrada de aire está compuesta por un tubo de  $\frac{1}{4}$  " con una longitud de 90 mm, este en uno de sus extremos presenta una conexión hembra de  $\frac{1}{2}$  pulgada (figura 3), esta se encuentra en el extremo interno que va dentro del

frasco para así unirse con la otra parte, el extremo superior fija la tubería a la tapa del envase.



**Figura 3. Detalle de la tubería y conexiones utilizadas para la entrada de aire al sistema de inmersión temporal artesanal**

La segunda parte de la tubería de entrada de aire (figura 4), también es de cobre de 1/4 de pulgada con una longitud de 110 mm, presenta en la parte superior una conexión macho de cobre que permite unir la primera parte y la segunda parte de la entrada de aire. En su extremo inferior se le colocó una bandeja seguido de una falda de cobre (disipador) que se utilizó para darle uniformidad al flujo de aire.



**Figura 4. Detalle de la tubería interna y conexiones utilizadas para el flujo de aire al sistema de Inmersión temporal artesanal**

Para fijar la tubería de entrada de aire al envase se procedió en primer lugar a perforar la tapa del envase con una broca ponchadora de 1/2 pulgada de diámetro. Seguidamente se incorporó a la tapa del

envase un niple de 1/2 pulgada el cual fue fijado a la tapa por la parte superior con el tapón plástico de 1/2 pulgada, el cual fue perforado en el centro con una mecha de 1/4 pulgada. Entre el tapón y la tapa del envase y en la parte inferior de la tapa y el niple con el anillo de 1/2" se colocaron sendas empacaduras de goma, de goma para evitar la fuga de aire (Figura 5)

#### Diseño y construcción del soporte para las vitroplantas

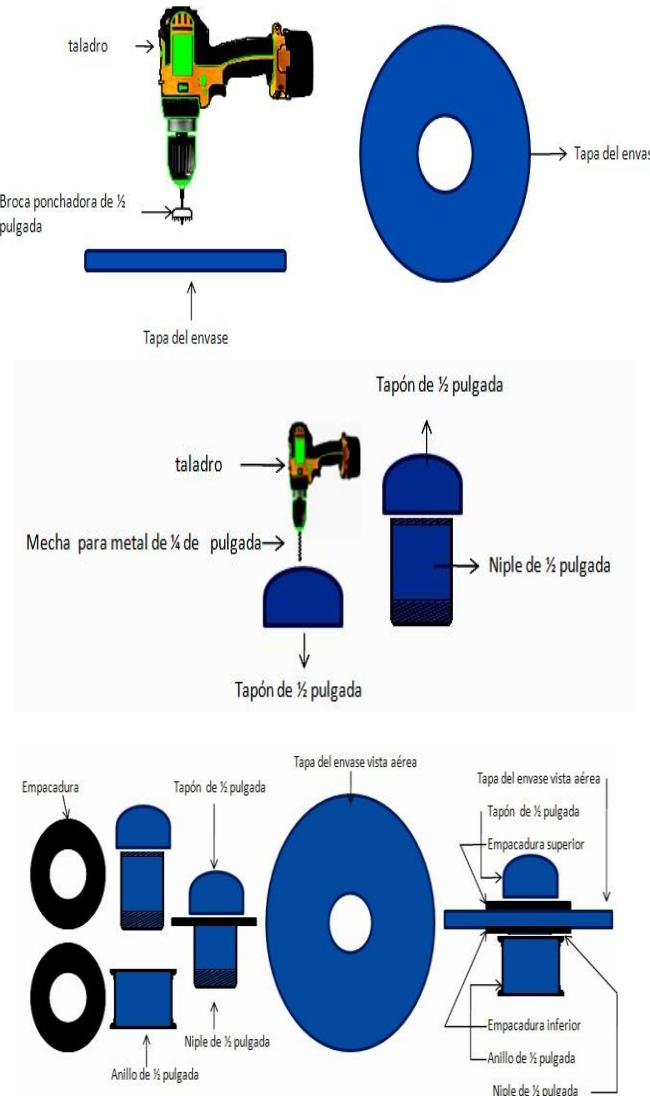
La bandeja donde se colocarían los brotes fue elaborada con lámina de aluminio corrugada. Para realizar la bandeja se tomó como base la medida de la circunferencia de la tapa del envase, ya que ésta debe ser un poco más pequeña para poder ser introducida dentro del envase. Se le restaron 12mm al diámetro de la circunferencia superior, luego se cortó la lámina de aluminio en una circunferencia con un diámetro de 70 mm para obtener la base de la bandeja. Posteriormente se perforó en el centro a la circunferencia, con una mecha de 1/4 pulgada, ese orificio sirvió para encajarla en la tubería de entrada de 1/4 pulgada, para finalizar a la base de la bandeja se le abrieron 32 agujeros con una mecha 1/8" ordenados en fila de cuatro con una separación de 5 mm entre cada uno y a 10 mm del agujero central que sostiene la bandeja. La función de estos 32 orificios es permitir la entrada y salida del medio y tener como resultado el humedecimiento de los brotes de manera uniforme.

El segundo componente de la bandeja, es una baranda, fabricadas del mismo material que se realizó la base. La baranda de la bandeja es una tira de 20 mm de ancho a la cual se le perforaron con una mecha de 1/8" 66 orificios equidistantes uno de otro, para permitir el drenaje del medio de cultivo (figura 6). Posteriormente fueron eliminadas, con una lima, algunas protuberancias que se formaron al perforar la lámina.

#### Ensamblaje de las partes del envase

Una vez construidas las partes integrantes del sistema de burbujeo se procedió a ensamblarlas. La tubería de cobre de la parte inferior se introduce, desde abajo, en el orificio central de la bandeja y es soportada por la falda que se hizo en el tubo, que tiene la función de disipar el flujo de aire y también soporta la bandeja. Esta estructura es unida con la

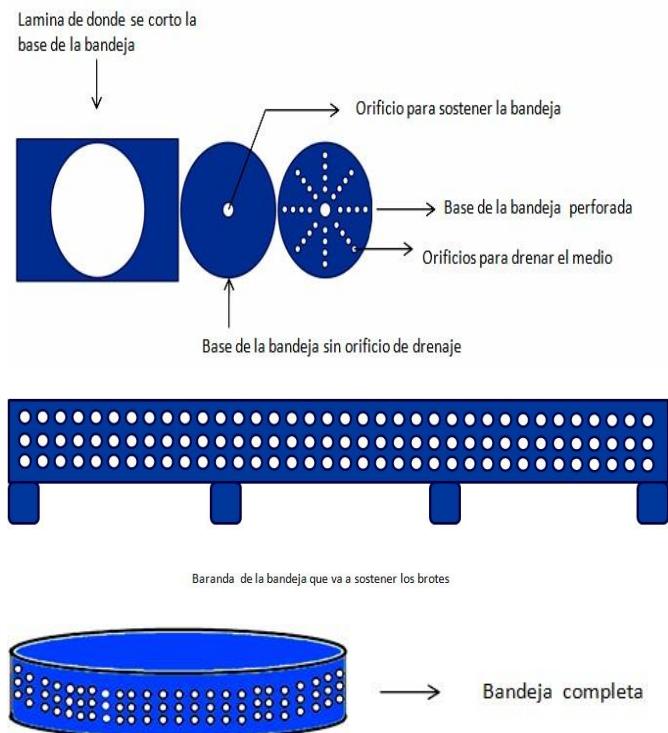
tubería de la tapa mediante una conexión de cobre que une las dos partes (figura 7).



**Figura 5. Detalles de la fijación de la tubería a las tapas del envase de inmersión temporal artesanal.**

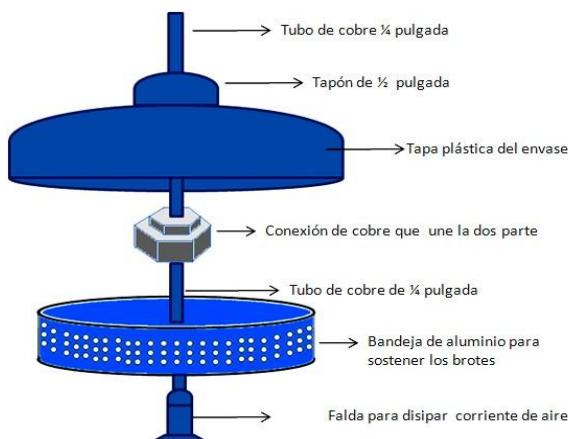
La Tubería de salida de aire de la tapa fue más sencilla de fabricar solo se necesitó tubería de cobre de  $\frac{1}{4}$  con 55 mm de longitud y una tubería 5/16 de 5mm de longitud ambas con copas en la parte inferior de ellas (Figura 8). En la tapa del envase se agregó una empacadura de goma, la cual fue fijada

con silicona resistente a altas temperaturas para evitar la fuga de aire entre la tapa y el envase o entrada de patógenos.

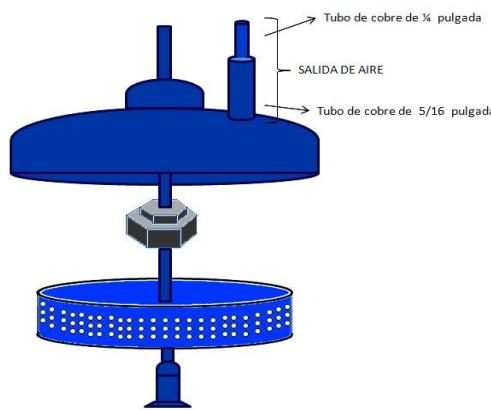


**Figura 6. Detalle de la bandeja para sostener el material vegetal en los envases del sistema de inmersión temporal artesanal.**

Construido en sistema de un envase se procedió a realizar las pruebas para evaluar su funcionamiento. Para ello se conectó al sistema de burbujeo de aire y se evaluaron posibles fugas de aire en el sistema, la eficiencia del burbujeo del medio de cultivo en mojar adecuadamente la bandeja, así como la adecuada salida del medio de cultivo de la bandeja porta explantes. Una vez realizadas con éxito las pruebas, se procedió a ensamblar cinco envases para la construcción del sistema completo, ya que la bomba utilizada para el suministro de aire tiene capacidad solo para el funcionamiento de cinco envases de manera simultánea (Figura 9).



**Figura 7. Ensamblaje de la tubería de acceso del aire a las tapas de los envases de inmersión temporal artesanal.**



**Figura 8. Detalle de la colocación del tubo de salida de aire de los envases de inmersión temporal artesanal.**



**Figura 9. Detalle del envase y los cinco envases componentes del sistema de inmersión temporal artesanal diseñado y construido e instalado junto al sistema RITA®.**

## CONCLUSIONES

Se logró el diseño, construcción y establecimiento de un sistema de inmersión temporal con materiales económicos y de fácil adquisición en el mercado local con funcionamiento similar al sistema de inmersión temporal RITA®.

## AGRADECIMIENTO

Los autores expresan su agradecimiento al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente que hizo posible el financiamiento de este trabajo mediante el proyecto de investigación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Ackermann, D.; Brusch, A.; Sonntag, K. y Sellner, M. 2003. Using the temporary immersion technique for *in vitro* culturing of renewable resources plants. Pp46-49 in: agricultural techniques and technologies on the light agenda
- Alvard D., Cote F. y Teisson C. 1993. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Plant cell Tissue and organ culture. 32: 55-60
- Amin M, Rahman M, Rahman W, Ahmed R., Hossain S. y Aahmed B 2005. Large scale plant regeneration *in vitro* from leaf-derived callus cultures of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr. cv. Giant Kew). Int. J. Bot. 1: 128-132.
- Casale I. y de García E. 1987. Multiplicación clonal acelerada de tres variedades de piña. ACEVIV 2: 318.
- Colmenares M. y Giménez C. 2003. Multiplicación *in vitro* de *Musa spp* de inmersión temporal. Revista Fac.Agron. La Universidad del Zulia (LUZ). [en línea]. Venezuela Maracaibo 2003[Fecha de consulta: 02 julio 2012]. Disponibles en: [http://www.revfacagronluz.org.ve/PDF/octubre\\_diciembre2003/Ra4037.pdf](http://www.revfacagronluz.org.ve/PDF/octubre_diciembre2003/Ra4037.pdf)
- Damiano C., Gentile A., La Starza S., Frattarelli A. y Monticelli, S. 2003. Automation in micropropagation through temporary immersion techniques. Acta Horticulturae 616:359-364.
- De Garcia E. Garay A. Vargas T y Blanco H. 2008. Micropropagación clonal masiva de piña (*Ananas comosus*). Mem. Inst.Biol. Exper. (UCV) 5: 181184.

- Dixon R. y González, R. 1994. Plant cell culture, a practical approach. England. Second edition. Oxford University Press, pp 199- 214
- Escalant J. Teisson C. y Cote F. 1994. Amplified somatic embryogénesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars (*musaspp*). *In vitro Cell Dev. Biol.* 30: 181-186.
- Firoozabady E. y Gutterson N. 2003. Cost-effective *in vitro* propagation methods for pineapple. *Plant Cell Rep.* 21: 844-850.
- Firoozabady C. y Moy Y. 2004. Regeneration of pineapple plants via somatic embryogenesis and organogenesis. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 40: 67-74.
- Kulkarni A. Ekambara K. y Joshi J. 2007. On the development of flow pattern in a bubble column reactor. *Experiments and CFD. Chemical Engineering Science*, 62:1049-1072pp.
- Lorenzo J., Gonzales B. Escalona M. Teisson C. Espinoza P. y Borroto C. 1998. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54:197-200pp.
- Mogollón N. Diaz J. y Hernandez N. 2004. Multiplicación clonal y enraizamiento *in vitro* de *Ananascomosus* L. "Queen Australia". *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 21: 15-21. pp.
- Ochieng, A. Onyango M. Kumar A. Kiriamiti K. y Musonge, P. 2007. Mixing in tank estirred by a Rushton turbina at a low clearance. *Chemical Engineering and processing: Process Intensification*, 47:842-851pp.
- Paredes M. 2005. Sistema de Inmersión Temporal en Biorreactores. *Revista Tierra Adentro* [en línea] mayo-junio 2005. [Fecha de consulta: 25 junio 2012]. Disponible en: <http://www.inia.cl/medios/quilamapu/pdf/tadentro/T A62MJA505.pdf>
- Roca, W. y Mronginski, L. 1993. Cultivo de tejido en la agricultura Fundamentos y Aplicaciones, (2 reimpr). Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) Cali, Colombia, 970 p.
- Rodríguez Y. Mosqueda M. Companioni B. Arzola M. Borrás O. Pérez M. Lorenzo J. y Santos R. 2002. Bioassay for *in vitro* differentiation of cultivar pineapples Resistance levels to Heart Rot disease. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 38: 613-616.
- Roostika I. Mariska I. 2003. *In vitro* culture of pineapple by organogenesis and somatic embryogenesis: its utilization and prospect. *BulAgroBio* 6:34-40.
- Rosales E. Rodríguez L. Alvarado O. Cárdenas M. 2003. Diseño y Construcción de un Sistema de Inmersión Temporal. *Revista Centro Agrícola Faculta Agronómica Autónoma de la Universidad de Nuevo León (FAUANL) y Centro de Investigación y Servicios Ambientales Tropical (CISAT)* enero-marzo 2003 [en línea]. [Fecha de consulta: 02 julio. 2012]. Disponibles en: <http://biblioteca.idict.villaclara.cu/UserFiles/File/revista%20centro%20agricola%20ciap/15.pdf>
- Saucedo S. Ramos E. Varas E. y Carmignani F. 2008. Propagación clonal *in vitro* de piña (*Ananas comosus* L. Merr) Variedades Champaka y Hawaiana. *Cienc. Tecnol.* 1: 49-54.
- Teisson C. Alvard D. Cote F. Berthouly M. y Lartaud M. 1994. Culture *in vitro* par immersion temporaire In: la culture *in vitro* des plantes tropicales CIRAD Coll. Repères. C. Teissonné: 7-13
- Vílchez J. Martínez I. Molina M. Pirela Figura 9. Detalle del envase y los cinco envases componentes del sistema de inmersión temporal artesanal diseñado y construido e instalado junto al sistema RITA®.
- C. Álvarez C. y Chirinos J. Multiplicación en Sistema de Inmersión Temporal Y Enraizamiento Ex Vitro de Ocumo Blanco (*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schott). *Revista SCIELO* [en línea]. Colombia Biotecnología vol 13n<sup>a</sup> 1Bogota junio-julio 2011 [Fecha de consulta: 08 julio 2012]. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S01234752011000100013&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S01234752011000100013&script=sci_arttext)
- Wild J. Poncin S. Huai-zhi L. y Olmos E. 2003. Some aspects of the hydrodynamics of bubble columns. *International Journal of chemical reaction Engineering* 7:1-38