

La tecnología para el cultivo de plantas: Sistemas de inmersión temporal

Marco Antonio Morales-Caporal¹,
Daniela Taxis-Rodríguez¹, Lilia Sánchez-Minutti¹

¹ Laboratorio de Procesos Biotecnológicos. Universidad Politécnica de Tlaxcala. Av. Universidad Politécnica de Tlaxcala No.1, San Pedro Xalcaltzinco, Tepeyanco 90180, Tlaxcala, México.

Autor de correspondencia: lilia.sanchez@uptlax.edu.mx

RESUMEN

La micropropagación de tejidos vegetales utilizando medios semi sólidos representa una alternativa para la producción de material vegetal libre de patógenos, sin embargo, presenta algunas desventajas como el costo por los agentes gelificantes, una limitada aireación y restricciones en la automatización y escalamiento del proceso. Una alternativa a estas problemáticas es el uso los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT). En estos sistemas, el material vegetal se cultiva dentro de contenedores y durante intervalos de tiempo programados el material vegetal se encuentra en contacto directo con el medio de cultivo y en los periodos donde no existe inmersión permanecen expuestos al aire, lo que favorece el intercambio gaseoso y ayudando a reducir la hiperhidricidad, que se hace evidente cuando el material vegetal se encuentra en contacto continuo con un medio líquido. En esta revisión bibliográfica se expone el diseño y funcionamiento de los SIT, según el tipo de contenedor o mecanismo de movimiento que emplean. Se describen los sistemas de frascos gemelos, de un solo contenedor y los basados en cambio de posición. Aunado a esto, se expresan las condiciones generales de operación y las ventajas y limitaciones que presentan. La información presentada busca proporcionar una visión general que permita comprender el funcionamiento de estos sistemas y que facilite la toma de decisiones para su selección y aplicación.

Palabras clave: Inmersión temporal, cultivo *in vitro*, Biorreactor



ABSTRACT

Micropropagation of plant tissues using semi-solid media represents an alternative for the production of pathogen-free plant material. However, it presents some disadvantages, such as the cost of gelling agents, limited aeration, and restrictions on process automation and scalability. An alternative to these problems is the use of Temporary Immersion Systems (TIS). In these systems, the plant material is grown inside containers and during programmed time intervals the plant material is in direct contact with the culture medium and in the periods where there is no immersion they remain exposed to the air, which favors gas exchange and helps to reduce hyperhydricity, which becomes evident when the plant material is in continuous contact with a liquid medium. This literature review describes the design and operation of TIS, according to the type of container or movement mechanism they employ. Twin-flask systems, single-container systems, and those based on position change are described. In addition, the general operating conditions, advantages, and limitations of these systems are discussed. The information presented aims to provide an overview that allows understanding of how these systems work and facilitates decision-making for their selection and application.

Keywords: Temporary immersion, *in vitro* culture, bioreactor

INTRODUCCIÓN

El cultivo de tejidos vegetales se ha apoyado de la técnica de micropropagación para la obtención y multiplicación de explantes. En la micropropagación, se produce un cultivo aséptico en recipientes con un medio de cultivo definido y en condiciones ambientales controladas (Kumar & Reddy, 2011). Las etapas que involucra este tipo de cultivo son: 0) obtención del material vegetal: aquí se seleccionan plantas vigorosas, viables y libres de enfermedades; 1) establecimiento del cultivo: se realiza una escisión de la planta seleccionada y su esterilización superficial. El explante inicial se establece en un cultivo a base de agar o medio de cultivo líquido, resultando en la activación del tejido vegetal y su multiplicación. La relativa escasez de explantes primarios y su tamaño hacen de esta etapa la más rentable y eficiente para la selección de material vegetal. 2) multiplicación: los explantes primarios seleccionados se transfieren asépticamente mediante varios subcultivos a nuevos medios de cultivo que favorecen la proliferación de propágulos clonales. 3) elongación y enraizamiento de las plántulas: tras repetidos subcultivos y análisis para detectar contaminación microbiana, las plántulas son cultivadas para detener la rápida multiplicación e iniciar el establecimiento de una planta completamente desarrollada (elongación del tallo, formación de raíces, estimulación de la fotosíntesis, función estomática...etc.). Estos cambios fisiológicos se logran mediante modificaciones en la composición de los medios de cultivo y condiciones ambientales. 4) aclimatación: las plantas son preparadas para ser cultivadas *ex vitro*, se modifican las condiciones ambientales, se agregan hormonas de enraizamiento, se promueve la formación de ceras cuticulares para aumentar la actividad fotosintética, la temperatura y humedad se regulan para ajustarse al entorno de un invernadero (Loberant & Altman, 2010).

Entre las ventajas de la micropropagación destacan la obtención de un gran número de plantas libres de patógenos en poco tiempo y con alta uniformidad (Kumar & Reddy, 2011), aunado a que se eliminan los factores geográficos y de clima que influyen los cultivos tradicionales. Entre las desventajas que presenta este tipo de cultivo destacan el uso frecuente de medios semi sólidos, los cuales son costosos y se requiere constante mano de obra, aunado a que el estado semi sólido del medio limita la posibilidad de automatización y se observa una mayor incidencia de anomalías como la hiperhidricidad, debido a su influencia en la absorción de agua y la transpiración de las plantas (Ivanova & Van Staden, 2011; Quiala et al., 2012) y en consecuencia, se ve limitado su escalamiento. Una alternativa a estas problemáticas son el uso de biorreactores y medios líquidos, estos pueden aumentar la tasa de multiplicación, automatizar el proceso y reducir la mano de obra (Roels et al., 2006).

Entre los biorreactores desarrollados para estos propósitos se encuentran los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT). En los SIT, el tejido vegetal o explantes se sumerge periódicamente en un medio nutritivo y luego se drena la solución nutritiva para permitir que el tejido vegetal acceda al aire (Afreen, 2008), esto es: permanecen fuera del medio de cultivo por ciertos periodos de tiempo. En estos sistemas, el tiempo de inmersión de la planta, el volumen del medio y volumen del recipiente son claves para lograr el máximo crecimiento de los explantes. Aunado a esto, dado que las condiciones de crecimiento son controladas, los SIT resultan útiles para la investigación científica dado que permite la reproducibilidad de los experimentos, uso eficiente del espacio y en algunos casos ha servido para la conservación de germoplasma. A gran escala se pueden utilizar para embriones somáticos de tamaño pequeño, el crecimiento de bulbos, cormos, microtubérculos, cultivos de brotes compactos, etc. (Afreen, 2008). Se ha reportado que también se

pueden reducir los costos de mano de obra, contenedores y agar en un 40% (Baltazar-Bernal & Mora-González 2024). Los nuevos sistemas de cultivo de plantas responden a la necesidad de propagar, mantener y conservar las especies y permiten optimizar el uso de los recursos necesarios para su crecimiento, así como satisfacer la demanda de mercado de plantas. En este documento se describe el funcionamiento de los SIT y algunos cultivos donde han sido utilizados.

2 CLASIFICACIÓN DE LOS SIT

Los SIT se clasifican en biorreactores de: frascos gemelos, de un solo contenedor y los basados en un el cambio de posición. A continuación, se brinda una descripción de estos sistemas:

2.1 Biorreactores de frascos gemelos

Constan de dos recipientes: uno llamado cámara con el cultivo vegetal y otro llamado cámara de almacenamiento del medio de cultivo. Estas cámaras están conectadas ya sea en la base o por su parte superior por mangueras flexibles y esterilizables. En los biorreactores conectados por la base, el medio de cultivo pasa de la cámara de medio de cultivo a la cámara de cultivo vegetal por medio del ingreso de aire estéril a baja presión; sin embargo, cuando están conectados por la parte inferior se requiere aire presurizado (Mirzabe et al., 2022). El aire es suministrado por bombas o por un compresor con una sobrepresión de 0.5 bar (Ducos et al., 2007) y el flujo es controlado por un temporizador y una válvula solenoide (0.8-1 L/min). Los frascos pueden ser de plástico esterilizable o vidrio. El volumen de medio de cultivo depende del tipo de planta cultivada y el tamaño de las cámaras, se ha documentado el uso de 25 mL hasta 5 L de medio de cultivo (Mirzabe et al., 2022). Entre los biorreac-

tores de frascos gemelos se encuentran los biorreactores de flujo y reflujo y el Biorreactor de Inmersión Temporal (Fig 1).

a) Los biorreactores de flujo y reflujo se caracterizan porque la cámara de cultivo vegetal y la de medio de cultivo están unidas por la base por medio de mangueras, la cámara de cultivo vegetal está por encima de la cámara de medio (Mirzabe et al., 2022) y el medio de cultivo pasa a intervalos de tiempo definidos de una cámara a otra. Estos biorreactores son de fácil construcción, automatización y utilizan poca energía (Georgiev et al., 2014). En este sistema, se han evaluado el cultivo de *Agave Tobala* (*Agave potatorum*) con tiempos de inmersión de 2 min por 4, 6, 12 y 15 h y 20 explantes por biorreactor y se han reportaron buenos rangos de multiplicación de plantas, aunque los brotes pueden presentar longitudes más cortas e hiperhidricidad si no se establecen adecuadamente los tiempos de



inmersión (Correa-Hernández et al., 2022). En el cultivo de manzana, se han probado tiempos de inmersión 15 min cada 24 h y 1 L de medio de cultivo (Chakrabarty et al., 2007) y en la planta *Anthurium andraeanum* se han evaluado tiempos de inmersión de 2 min cada 4,8 y 24 h con 500 mL de medio de cultivo (Martínez-Estrada et al., 2019). El escalamiento del cultivo de plantas en este tipo de biorreactores es un reto para la optimización tecnológica, sin embargo, ya se han descrito protocolos de propagación de orquídeas a pequeña escala (Baltazar-Bernal & Mora-González 2024). Algunas estrategias como la aplicación de fitohormonas después del cultivo vegetal para mejorar el enraizamiento resultarían útiles en aplicaciones como la reforestación de poblaciones silvestres y para la plantación de especies comerciales para la industria del mezcal (Correa-Hernández et al., 2022).

b) El Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT) es un sistema cuyas cámaras de cultivo vegetal y de medio de cultivo están unidas por la parte superior por medio de una manguera, la cual sirve para transportar el medio de cultivo entre ellas y dejar expuestos los explantes al aire. El BIT permite un control de la esterilidad por largos periodos de tiempo, aunque no cuentan con un sistema de renovación del medio de cultivo ni ventilación forzada y no cuentan con un puerto externo para el CO₂ (Georgiev et al., 2014). En el cultivo de kiwi se ha reportado que el uso del BIT favorece la multiplicación de hojas y brotes gracias a la oxigenación periódica que brinda este biorreactor, aunque pueden presentar menor eficiencia en los procesos de aclimatación; estas plantas se ha introducción con éxito en Ixhuatlán del Café, Veracruz, México, lo que demuestra el potencial de las técnicas *in vitro* (López-Páez et al., 2025). También se ha utilizado este biorreactor para el cultivo de gerberas con tiempos de inmersión de 3 min cada 6 h y 250 mL de medio de cultivo (Mosqueda Fròmeta et al., 2017) y en *Stevia rebaudiana* se han utilizado 250 mL de medio de cultivo y tiempos de inmersión de 5 min cada 0.5, 0.75, 1, 2, 3 h y 7 min (Phuc et al., 2017).

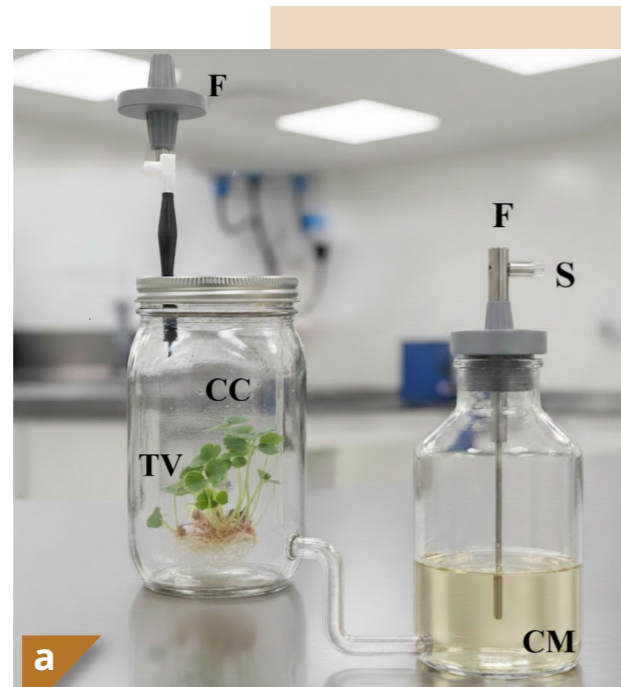


Figura 1. Biorreactores de frascos gemelos. a) De flujo y reflujo y b) Biorreactor de Inmersión Temporal. CC: cámara de cultivo, CM: cámara de medio de cultivo, F: filtro, E: entrada de aire, S: salida de aire y TV: tejido vegetal.

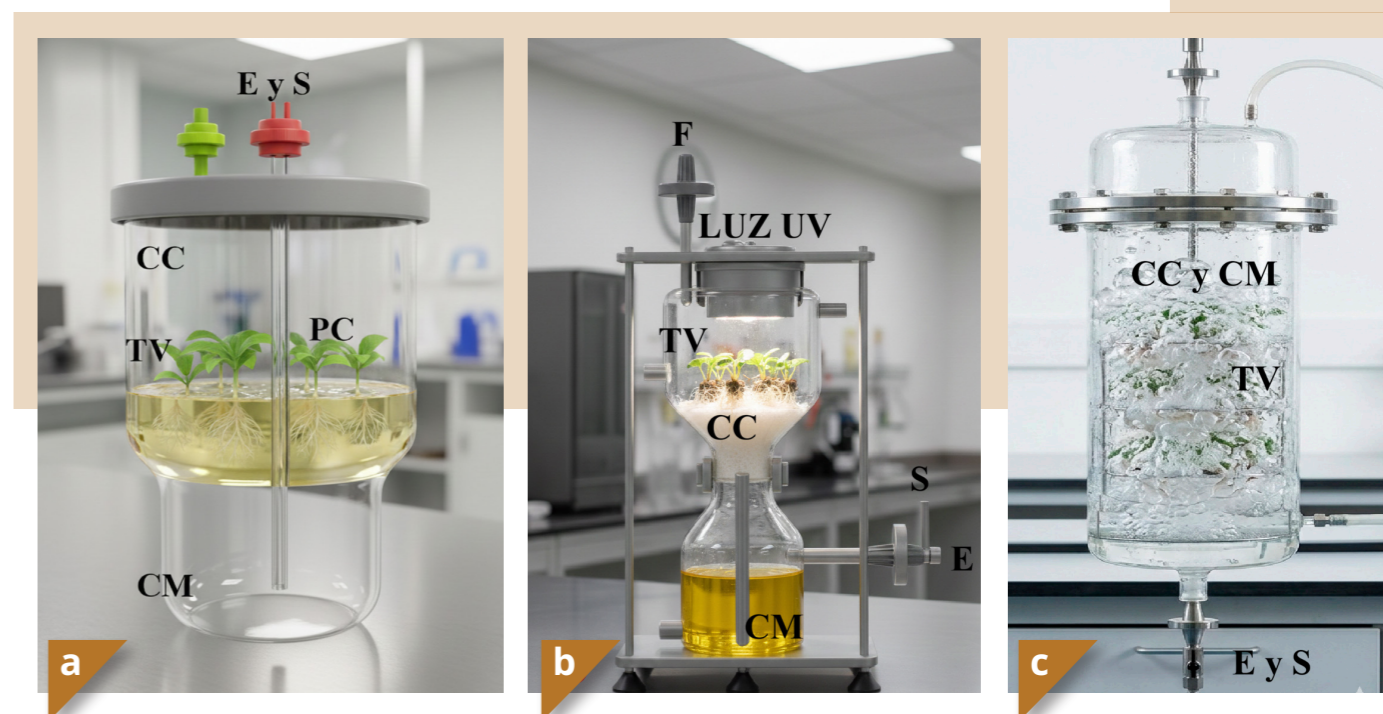
2.2 Biorreactores de un solo contenedor

Estos biorreactores presentan integradas la cámara de cultivo vegetal y la de medio de cultivo en un solo recipiente, donde la primera está en la parte superior y la segunda en la parte inferior. El medio de cultivo puede moverse ya sea por medio de soportes mediante un cilindro neumático o por el ingreso de aire a través de un tubo y filtro (Mirzabe et al., 2022). Ejemplos de estos biorreactores son el Recipiente Automatizado de Inmersión Temporal (RITA), el termofotobiorreactor y el Biorreactor de Inmersión por Burbujas (BIB), (Fig 2).

a) El RITA utiliza un recipiente de polipropileno donde las plantas están separadas por una malla de la cámara de medio de cultivo y por un puerto central ingresa aire que mueve el medio de cultivo hacia la parte superior del biorreactor, impregnando los tejidos vegetales con el líquido. El flujo de aire es suministrado por un compresor a sobrepresión inferior de 0.2 bar y el flujo de aire a través de cada recipiente debe ser controlado (0.8 a 1 L/min) mediante una válvula para reducir la velocidad de burbujeo cuando las plantas están sumergidas (Vitropic, 2018). El volumen de medio de cultivo regularmente está en el rango

de 100-300 mL (Mirzabe et al., 2022). Este biorreactor es fácil de operar y brinda suficiente humedad relativa al cultivo (Georgiev et al., 2014), además de presentar la ventaja de reducir la incidencia de hiperhidricidad en algunos cultivos como el de pistacho (la hiperhidricidad es la acumulación de agua que provoca hinchazón de los tejidos y se observa cuando se cultivan explantes que están en contacto permanente con el medio de cultivo). En el pistacho, se han evaluado tiempos de inmersión de 16 min cada 8, 12 y 24 h con 200 mL de medio de cultivo y un fotoperiodo de 16 h bajo luz blanca fría (Akdemir et al., 2014). En cultivo de papa se ha evaluado el tiempo de inmersión de 4 min cada 3 h con 750 mL de medio de cultivo y se reportó el excelente potencial del biorreactor para la producción comercial de microtubérculos (yFigueroa et al., 2021). En plantas de café con tiempos de inmersión de 3 min cada 6 h se reportó una producción de embriones 1.65 veces más rápida que el cultivo convencional (Mwaniki, 2021). En el cultivo de *Laelia speciosa* se reportó la producción de flavonoides, polifenoles y actividad antioxidante al someter las plantas a una inmersión de un minuto cada 8 h (López-Escamilla et al., 2024).

Figura 2. Biorreactores de un solo contenedor. a) Recipiente Automatizado de Inmersión, b) Termofotobiorreactor y c) Biorreactor de Inmersión por Burbujas. CC: cámara de cultivo, CM: cámara de medio de cultivo, F: filtro, E: entrada de aire, S: salida de aire, TV: tejido vegetal y PC: puerto central.



b) El termofotobiorreactor contiene en su parte inferior una doble pared que forma una camisa de agua para controlar la temperatura y en la parte superior una lámpara de luz UV (Mirzabe et al., 2022), fue diseñado para el cultivo de plantas extremófilas y resulta de fácil automatización, sin embargo, su principal desventaja es su compleja construcción y costo (Georgiev et al., 2014). El suministro de aire se realiza con un compresor y el volumen máximo del recipiente es de 1500 mL. Este biorreactor fue diseñado exclusivamente para el cultivo de *Deschampsia antarctica*, una especie de pasto de la Antártida caracterizado por su capacidad de autopolinización y ha sido patentado en los Estados Unidos (Navarro et al., 2013).

c) El BIB consta de un recipiente donde los explantes se encuentran en la parte superior y el aire es ingresado por la parte inferior de la cámara de cultivo vegetal. Los explantes son sumergidos en espuma, la cual se origina por aireamiento del medio de cultivo que contiene Tween 20 (Mirzabe et al., 2022; Scheidt et al., 2009). En este biorreactor se suministra aire con un compresor a baja presión (0.5 bar) y el volumen del medio de cultivo depende del tamaño de las cámaras de cultivo. En estos biorreactores, el drenado y el detergente puede limitar el crecimiento de plantas sensibles. En plantas del árbol de té se han utilizado 200 mL de medio de cultivo con 1 gota de Tween 20 y luz blanca ($32 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$), se ha observado la ausencia de hiperhidricidad y excelentes resultados en la producción de biomasa: masa fresca total y brotes, asociados a un mayor espacio interno del biorreactor (Scheidt et al., 2011). El biorreactor puede resultar prometedor para producción de especies ornamentales, permitiendo una buena nutrición, luminosidad y homogeneización del aire y consecuentemente una mejor productividad (Scheidt et al., 2009).

2.3 Biorreactores basados en el cambio de posición

Estos biorreactores pueden contener uno o más recipientes y la inmersión de las plantas en el medio de cultivo se logra gracias al movimiento del recipiente por diversas fuerzas por lo que ya no es necesario el uso de bombas y/o tuberías. Entre estos biorreactores se encuentran el de balancín, BioMint y el de tambor giratorio (Fig 3).

a) El biorreactor en balancín utiliza dos recipientes rectangulares, en cada uno de ellos están los explantes y el medio de cultivo juntos y son balanceados por medio de estantes inclinados (Mirzabe et al., 2022), esto significa que la cámara de cultivo vegetal y la de medio de cultivo comparten el mismo espacio físico. El medio de cultivo se desplaza lentamente, por lo cual no necesitan conexiones ni bombas para recircularse. En estos sistemas es necesario una inclinación adecuada de la cámara de cultivo vegetal y el medio no puede ser renovado, su principal ventaja radica en

que se pueden colocar múltiples cajas sin necesidad de un sistema de aireación (Georgiev et al., 2014). Un punto crítico en estos biorreactores es el volumen del medio de cultivo, dado que un exceso o una mala inclinación del recipiente puede evitar la intermitencia en la inmersión. Frecuentemente se utilizan entre 50 y 100 mL de medio de cultivo (Mirzabe et al., 2022). Los biorreactores en balancín se han usado en el cultivo de avellana híbrida y se ha reportado un buen enraizamiento de los explantes y una mayor tasa de supervivencia durante la aclimatación y el trasplante a campo (Nicholson et al., 2020). En el cultivo de café se ha reportado un eficiente proceso de multiplicación por esquejes y un buen enraizamiento de las plantas cuando se usaron 50 mL de medio de cultivo con tiempos de inmersión de 7 s cada 32 s (Valdés et al., 2021). En el cultivo de *Curcuma longa* L. se han reportado resultados satisfactorios cuando se utilizan 200 mL de medio de cultivo, luces fluorescentes blancas ($30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y una rotación por minuto (El-Hawaz et al., 2015).

b) El biorreactor BioMint es parecido al de balancín; sin embargo, los recipientes son cilíndricos y los explantes están separados del medio de cultivo por una placa perforada que permite el flujo del medio y la ventilación forzada (Mirza-

be et al., 2022). En este biorreactor los explantes pueden estar separados de la cámara de medio de cultivo completamente y se puede enriquecer la cámara de cultivo vegetal con CO_2 (Georgiev et al., 2014). Estos biorreactores son de fácil construcción y se puede diseñar con sistemas complejos de plataformas accionadas por motores eléctricos o sustituirlos por sistemas neumáticos (Sereda, 2024). El volumen de medio de cultivo utilizado puede ir en rangos de 200 – 500 mL (Mirzabe et al., 2022). En el cultivo de caña de azúcar con 400 mL y un tiempo de inmersión de 4 min cada hora se ha reportado un porcentaje de supervivencia, peso seco y coeficiente de multiplicación superior que cuando se utilizan otros volúmenes de medio de cultivo (Daniels et al., 2018).

c) El biorreactor de tambor giratorio contiene el medio de cultivo y los explantes en una botella, la cual contiene un soporte para las plantas y es agitado por medio de un sistema de rodillos (Mirzabe et al., 2022). El soporte puede ser de acero inoxidable o espuma de poliuretano y tiene la función de retener los explantes en cada giro, evitando el contacto permanente con el medio de cultivo. Es un sistema simple, sin embargo, requiere de un alto esfuerzo cortante y no tiene ventilación forzada (Mirzabe et al., 2022). El volumen del medio de cultivo a utilizarse depende del tipo de planta y del tamaño de la botella. Este tipo de biorreactor se ha utilizado para el cultivo de microtúbulos de papa con un volumen de medio de cultivo de 200 mL y una rotación de 1 rpm y se observó el incremento de tubérculos en comparación con un sistema sin agitación (Akita y Ohta 1998). En el cultivo de estevia se evaluaron volúmenes de 25, 50 y 100 mL de medio de cultivo y una velocidad de rotación de los discos de 1.5 – 4.0 x g y se observó que el crecimiento de las raíces depende del volumen y la densidad del inóculo (Reis et al., 2011).

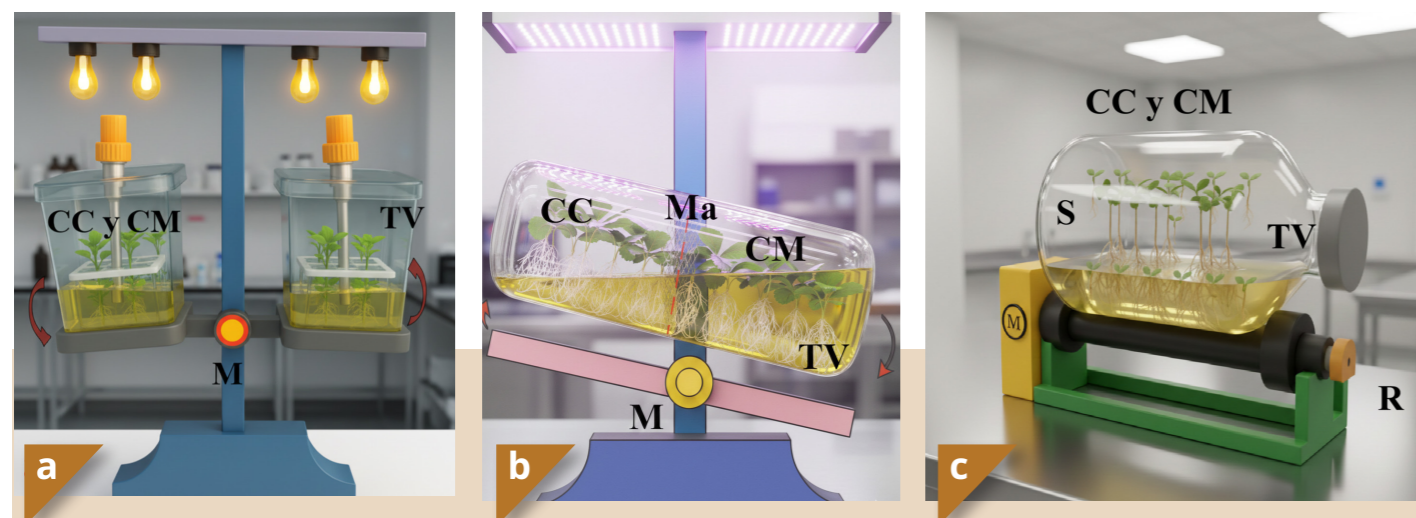


Figura 3. Biorreactores basados en el cambio de posición. a) En balancín, b) BioMint y c) Tambor giratorio. CC: cámara de cultivo, CM: cámara de medio de cultivo, TV: tejido vegetal, M: motor, Ma: Malla y R: rodillo.

3 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS SIT

El desarrollo de la micropropagación del medio semi sólido al medio líquido y su aplicación en biorreactores ha contribuido a reducir algunas problemáticas relacionadas con los costos y fenómenos no deseados en el cultivo de plantas. De acuerdo con Afreen (2008), las principales ventajas de un SIT son: a) la reducción de la hiperhidricidad, en comparación con la inmersión permanente que una planta tiene al someterse a un medio líquido, b) el control en el crecimiento y el desarrollo de las plantas debido a la modificación de la frecuencia y duración de la inmersión y c) el bajo estrés mecánico en los tejidos vegetales debido a la ausencia de agitación o aireación.

Aunque los SIT pueden presentar ventajas sobre los cultivos líquidos y semi sólidos, estas dependen más bien de tipo de planta, las condiciones



de operación del SIT y la composición química del medio de cultivo. Por ejemplo: en el cultivo de *A. potatorum* en un biorreactor de flujo y reflujo, la hiperhidricidad en medio semi sólido fue del 12%, mientras que en el SIT fue del 58%; sin embargo, aumentó el número de brotes por explante hasta casi cinco veces más (Correa-Hernández et al., 2022). En brotes proliferados de pistacho se ha observado la ausencia de necrosis de la punta del brote cuando son cultivados en el RITA en comparación con los medios semi sólidos, pero el enraizamiento fue mejor en medio semi sólido (Akdemir et al., 2014). Por otro lado, el cultivo de kiwi usando un BIT demostró mayor eficiencia en la multiplicación de hojas y brotes, pero presentó el menor porcentaje de aclimatación (López-Páez et al., 2025). Algunas desventajas de los SIT se pueden evitar si se optimizan las condiciones de operación del biorreactor o se aplican tratamientos fitohormonales previo a la aclimatación.

4 CONCLUSIONES

Los Sistemas de Inmersión Temporal representan una alternativa viable para el cultivo de diversas plantas, mostrando un buen desempeño en comparación con los cultivos semi sólidos. En algunos casos se ha observado una mejora en la proliferación de brotes, formación de raíces y supervivencia en la aclimatación, también se ha reportado una reducción en la hiperhidricidad en comparación con las plantas que están permanentemente sumergidas en un medio líquido y una reducción de costos de mano de obra debido a la automatización y la ausencia de agentes gelificantes que encarecen el proceso.

Su uso a mediana y gran escala también ha evidenciado su utilidad práctica ayudando a la propagación y conservación de plantas y se puede contribuir con la reforestación de ecosistemas alterados. Los Sistemas de Inmersión Temporal presentan algunos desafíos en cuanto a su diseño y escalamiento y generan oportunidades de investigación para la optimización de los parámetros de operación, aplicación en diversas especies de plantas y su integración en procesos industriales.

5 AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Politécnica de Tlaxcala.



REFERENCIAS

- Afreen F (2008) Temporary immersion bioreactor. In Plant tissue culture engineering. Edited by SD Gupta and Y Ibaraki. Dordrecht: Springer, Netherlands. 187-201 pp.
- Akdemir H, Süzerer V, Onay A, Tilkat E, Ersali Y, Çiftçi YO (2014) Micropropagation of the pistachio and its rootstocks by temporary immersion system. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 117:65-76.
- Akita M, Ohta Y (1998) A simple method for mass propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.) using a bioreactor without forced aeration. *Plant Cell Rep* 18:284-287.
- Baltazar-Bernal O, Mora-González EG (2024) Micropropagation of *Encyclia cordigera* (Kunth) Dressler in ebb-and-flow bioreactor. In *Micropropagation Methods in Temporary Immersion Systems*. Edited by MA Ramírez-Mosqueda and CA Cruz-Cruz. Springer, New York. 137-147 pp.
- Correa-Hernández L, Baltazar-Bernal O, Sánchez-Páez R, Bello-Bello JJ (2022) In vitro multiplication of agave tobalá (*Agave potatorum* Zucc.) using ebb-and-flow bioreactor. *S. Afr. J. Bot.* 147:670-677.
- Chakrabarty D, Dewir YH, Hahn EJ, Datta SK, Paek KY (2007) The dynamics of nutrient utilization and growth of apple root stock "M9 EMLA" in temporary versus continuous immersion bioreactors. *Plant Growth Regul* 51:11-19.
- Daniels D, Itza C, Pat J, Guerra D, Williams S (2018) Enhancing the Protocol for Efficient Sugarcane (*Saccharum officinarum*) Micropropagation using the BioMINT Temporary Immersion System in the Variety B79-474. *Int J Sci Eng Res* 6:8-11.
- Ducos JP, Labbe G, Lambot C, Pétiard V (2007) Pilot scale process for the production of pre-germinated somatic embryos of selected robusta (*Coffea canephora*) clones. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 43:652-659.
- El-Hawaz RF, Bridges WC, Adelberg JW (2015) In vitro growth of *Curcuma longa* L. in response to five mineral elements and plant density in fed-batch culture systems. *PLoS One* 10:e0118912.
- Georgiev V, Schumann A, Pavlov A, Bley T (2014) Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Eng. Life Sci.* 14:607-621.
- Ivanova M, Van Staden J (2011) Influence of gelling agent and cytokinins on the control of hyperhydricity in *Aloe polyphylla*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 104:13-21.
- Kumar N, Reddy MP (2011) In vitro plant propagation: a review. *J For Environ Sci* 27:61-72.
- Loberant B, Altman A (2010) *Micropropagation of plants*. Encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation, and cell technology. Wiley, New York.
- López-Escamilla AL, Badillo-Huerta V, Rodríguez-Cuamatzi P, García-Dávila J, Sánchez-Minutti L (2024) Bioactive compounds in *Laelia speciosa* (Orchidaceae) seedlings grown in temporary immersion bioreactor. *Mex J Biotechnol* 9:19-32.
- López-Páez FK, Galindo-Tovar ME, García-Martínez MÁ, Serna-Lagunes R, Solano-Rodríguez LA, Pastelín-Solano MC, Castañeda-Castro O, Cruz-Castillo JG (2025) Multiplication of *Actinidia chinensis* var. *deliciosa* in three in vitro culture systems. *N Z J Crop Hortic Sci* 1-11.
- Martínez-Estrada E, Islas-Luna B, Pérez-Sato JA, Bello-Bello JJ (2019). Temporary immersion improves in vitro multiplication and acclimatization of *Anthurium andreaeanum* Lind Sci Hort 249:185-191.
- Mirzabe AH, Hajjahmad A, Fadavi A, Rafiee S (2022) Temporary immersion systems (TISs): A comprehensive review. *J Biotechnol* 357:56-83.
- Mosqueda Frometa O, Escalona Morgado MM, Teixeira da Silva JA, Pina Morgado DT, Daquinta Gradaille MA (2017) In vitro propagation of *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hooker f. in a temporary immersion bioreactor. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 129:543-551.
- Mwaniki IW (2021) Optimising Somatic Embryos Formation in *Coffea arabica* cultivar ruiru using temporary immersion systems In Kenya. JKUAT-IBR.
- Navarro GEZ, Honorato AES, Oyarzun AGC, Rodríguez EAT, Encalada HGP, Cantillana PAZ (2013) U.S. Patent Application No. 13/884,365.
- Nicholson J, Shukla, MR, Saxena, PK (2020) In vitro rooting of hybrid hazelnuts (*Corylus avellana* × *Corylus americana*) in a temporary immersion system. *Botany* 98: 343-352.
- OpenAI. (2026). Biorreactores [imágenes generadas con IA]. <https://gemini.google.com>
- Phuc VT, Trung NM, Thien HT, Tien LTT (2017) Proliferation and ajmalicine biosynthesis of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don adventitious roots in self-built temporary immersion system. In: AIP Conference Proceedings. AIP Publishing LLC, p. 20018.
- Quiala E, Canal MJ, Meijon M, Rodríguez R, Chavez M, Valledor L, Fera M, Barbon R (2012) Morphological and physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BA treatments. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 109:223-234.
- Reis RV, Borges APPL, Chierrito TPC, de Souto ER, de Souza LM, Iacomini, M, de Oliveira AJB, Gonçalves RAC (2011) Establishment of adventitious root culture of *Stevia rebaudiana* Bertoni in a roller bottle system. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 106:329-335.
- Roels S, Noceda C, Escalona M, Sandoval J, Canal MJ, Rodrigues R, Debergh P (2006) The effect of headspace renewal in a temporary immersion bioreactor on plantain (*Musa AAB*) shoot proliferation and quality. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 84:155-163.
- Scheidt GN, Arakaki AH, Chimilovski JS, Portella ACF, Spier MR, Woiciechowski AL, Biasi AL, Soccol CR (2009) Utilization of the bioreactor of immersion by bubbles at the micropropagation of *Ananas comosus* L. Merrill. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 52:37-43.
- Scheidt GN, Silva AD, Oliveira YD, Costa JDL, Biasi LA, Soccol CR (2011) In vitro growth of *Melaleuca alternifolia* Cheel in bioreactor of immersion by bubbles. *Pak. J. Bot.* 43:2937-2939.
- Sereda M 2024 Micropropagation of *Vaccinium corymbosum* L. 'Bluecrop' in rocker temporary immersion system (TIS) bioreactor. *Yuz. Yil Univ. J. Agric. Sci* 34:442-451.
- Vitropic (2018) *RITA®: Temporary immersion bioreactor system manual*. <https://www.vitropic.fr/pdf/Manual-RITA-EN.pdf>
- Valdés YC, Shukla MR, Vega MEG, Saxena PK (2021). Improved conservation of coffee (*Coffea arabica* L.) germplasm via micropropagation and cryopreservation. *Agron* 11:1861.
- yFigueroa MDL, Tapia JFB, Hajari E, Escalona M, Etienne H, Feijoo JCL (2021) Agronomic performance of temporary immersion bioreactor-derived potato microtubers in a peruvian low input cropping agriculture system. *Afr J Biotechnol* 21:125-132.

