

Biofactory and temporary immersion bioreactor: *In vitro* propagation of *Anthurium andreaeanum* L., and economic viability

Biofábricas y biorreactores de inmersión temporal: Propagación *in vitro* de *Anthurium andreaeanum* L., y su viabilidad económica

Alamilla-Magaña, Juan C.¹; Caamal-Velázquez, José H.^{1*}; Criollo-Chan, María A.²; Vera-López, Javier E.¹; Reyes-Montero, José A.²

¹Colegio de Postgraduados Campus Campeche. Carretera Federal Haltúnchen-Edzná km 17.5, Sihochac, Champotón, Campeche, México. C. P. 24050. ²Investigador Independiente. Calle 20 S/N Frente taller pinkus, Calkini, Campeche. C.P. 24900.

*Autor de correspondencia: hcaamal@colpos.mx.

ABSTRACT

Objective: Evaluate technical and financial feasibility for implementation of a biofactory for *in vitro* propagation of *Anthurium andreaeanum* L.

Design/methodology/approach: The experiment had a completely random distribution. Data were subjected to a one-way analysis of variance (ANOVA), means were compared using Duncan's test ($P \leq 0.05$). In order to calculate the economic viability of the Biofactory, the indicators Equilibrium Point, Benefit/Cost Ratio, Net Present Value (VAV) and Internal Rate of Return (IRR) were determined.

Results: Commercial SIT Automated Temporary Immersion Vessel (RITA[®]) was used in this study. An average multiplication rate of 26.4 shoots per explant was obtained using liquid medium supplemented with 2 mg L⁻¹ of 6-bencylaminopurine. For the establishment of the biofactory 210 RITA[®] were used, with an installed capacity to obtain approximately 400,000 seedlings per year. When performing the financial analysis of this technique, it yielded an Internal Rate of Return of 73.64% and a Cost Benefit Ratio of 1.67 and a Net Present Value of MEX \$2,513,056.14 Mexican pesos (US\$ 131230.08), over a period of 5 years. These results demonstrated the economic and technical feasibility for the implementation of a biofactory producing anthuriums.

Limitations on study/implications: The use of semi-solid culture media in the multiplication stage reduces the production capacity and significantly reduces the profitability of the Biofactory.

Findings/conclusions: The profitability of a biofactory for the production of anthuriums depends on the multiplication rate, achieved in this case through the use of RITA[®], currently has the complete and proven technology to be transferred to any interested entrepreneur.

Keywords: Automated Temporary Immersion Vessel (RITA[®]), Internal Rate of Return (IRR), Net Present Value (NPV).

RESUMEN

Objetivo: Evaluar la viabilidad técnica y financiera para la implementación de una biofábrica para la propagación *in vitro* de *Anthurium andreaeanum* L.

Diseño/metodología/aproximación: El experimento tuvo una distribución completamente al azar. Los datos se sometieron a un análisis unidireccional de varianza (ANOVA), las medias se compararon mediante la prueba de Duncan ($P \leq 0,05$). Con el fin de calcular la viabilidad económica de la Biofábrica, se determinaron los indicadores de Punto de Equilibrio, Relación Beneficio/Costo, el Valor Actual Neto (VAV) y la Tasa Interna de Retorno (TIR).

Resultados: En este estudio se utilizó el SIT comercial Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado (RITA[®]). Se obtuvo una tasa promedio de multiplicación de 26.4 brotes por explante utilizando medio líquido suplementado

Agroproductividad: Vol. 12, Núm. 10, octubre. 2019. pp: 23-29.

Recibido: marzo, 2019. **Aceptado:** septiembre, 2019.



con 2 mg L⁻¹ de 6-bencilaminopurina. Para el establecimiento de la biofábrica se utilizaron 210 RITA[®], con una capacidad instalada para obtener aproximadamente 400,000 plántulas al año. Al realizar el análisis financiero de esta técnica, arrojó una Tasa Interna de Retorno de 73.64% y una Relación Beneficio Costo de 1.67 y un Valor Actual Neto de MEX \$2,513,056.14 pesos mexicanos (US\$ 131230.08), en un periodo de 5 años. Con estos resultados se demostró la viabilidad económica y técnica para la implementación de una biofábrica productora de anturios.

Limitaciones del estudio/implicaciones: Utilizar medios de cultivo semisólidos en la etapa de multiplicación, disminuye la capacidad de producción y baja de manera significativa la rentabilidad de la Biofábrica.

Hallazgos/conclusiones: La rentabilidad de una biofábrica para la producción de anturios depende de la tasa de multiplicación, alcanzada en este caso a través del uso del RITA[®], actualmente se cuenta con la tecnología completa y comprobada para ser transferida a algún emprendedor interesado.

Palabras claves: Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado (RITA[®]), Tasa Interna de Retorno (TIR), Valor Actual Neto (VAN).

Hoy en día la horticultura ambiental ha cobrado un gran interés no solo por la vistosidad y belleza que tiene las plantas ornamentales, sino por la decoración del ambiente (Hernández, 2004). El anturio (*Anthurium andreanum* L.) es de la familia de las Araceae, la cual es una planta herbácea perenne originaria de los bosques lluviosos de las zonas de los Andes (Morales *et al.*, 2014). Esta planta es considerada como flor de interés comercial con rendimientos económicos bastantes favorables, debido a que es altamente apreciada en el trópico mexicano y a nivel mundial, su propagación tradicional es lenta desde la germinación hasta la floración y esto es influenciado por la variación genética y la baja tasa anual de obtención de hijuelos, de tres a cuatro años (Lee *et al.*, 2003).

En la actualidad existen numerosos trabajos en donde se evalúan diferentes concentraciones hormonales y condiciones de crecimiento para la propagación *in vitro* de anturios (Montes *et al.*, 2004; López *et al.*, 2013; Atak y Çelik, 2009; Murillo *et al.*, 2014; Marques Pinheiro *et al.*, 2014; Martínez estrada *et al.*, 2016); el objetivo de este trabajo fue demostrar la eficacia en el escalamiento y la viabilidad económica, en la propagación de anturio (*Anthurium andreanum* L.) utilizando un sistema RITA[®] como una estrategia para la producción comercial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

La presente investigación se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos del Colegio de Postgraduados Campus Campeche, México. Para iniciar este trabajo se emplearon segmentos nodales de plántulas de seis meses de edad, establecidas *in*

INTRODUCCIÓN

Una biofábrica es un laboratorio de cultivo de tejidos con capacidad para producir una especie vegetal dada, en forma masiva y con un protocolo de propagación establecido. Puede también considerarse como una instalación que propaga una serie de plantas a escala industrial o semi-industrial, en donde no solo se atienden actividades técnicas, como en un laboratorio, sino además cuestiones administrativas relacionadas con la rentabilidad de la empresa. Cuando la micropropagación se requiere llevar a un ámbito comercial, existen dos factores que incrementan considerablemente los costos de producción: 1) La mano de obra que representa entre 40-90% de los costos de producción; y 2) Los agentes gelificantes que representan entre un 70-90% de los costos del medio de cultivo (Prakash *et al.*, 2004; Etienne y Berthouly, 2002; Albany *et al.*, 2015), una de las estrategias para disminuir los costos de producción y aumentar la tasa de multiplicación, es la implementación de Sistemas de Inmersión Temporal (SIT).

Con el avance de la tecnología, se han desarrollado e implementado nuevas técnicas utilizando SIT que fortalecen al método tradicional de propagación, debido a que permite semi-automatizar la producción a gran escala, obteniendo mejores rendimientos de producción, la eliminación de algunos problemas fisiológicos, y la disminución de costos en la multiplicación; actualmente existen comercialmente SIT como son el RITA[®] y MATIS[®] (CIRAD, Francia), el SETIST[™] (Vervit, Bélgica), PLANTIMA (A-Tech), el BIOMINT[®] (CICY, México), MicroRoker (We Vitro, Canadá), entre otros diseños no comerciales (Hernández-Soto *et al.*, 2008; Georgiev *et al.*, 2014; Morales *et al.*, 2014; Welander *et al.*, 2014; Bello Bello *et al.*, 2019; Martínez Estrada *et al.*, 2019).

in vitro, para la inducción y formación de brotes se empleó el medio de cultivo semisólido MS propuesto por Murashige y Skoog (1962) a la mitad de la fuerza suplementado con 3% de sacarosa y modificado a tres concentraciones diferentes de 6-bencilaminopurina (BAP) con 0.5, 1 y 2 mg L⁻¹ de BAP y gelificado con 0.25% de Gellant Gum Powder (Phytotechnology®), el pH se ajustó a 5.7, se esterilizó a 120 °C a 1 kg cm⁻² por 15 min y se vertió 20 mL de medio en frascos de vidrio con volumen de 100 mL. Se utilizaron 3 explantes por cada recipiente, se realizaron 5 repeticiones por concentración y se incubaron por 16 semanas en un cuarto de incubación a 25 ± 2 °C con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad.

Medio líquido para RITA®

Para el medio líquido a utilizarse en el SIT se preparó medio MS líquido suplementado con 2 mg L⁻¹ de BAP y 3% de sacarosa. En este tratamiento se utilizaron Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado (RITA®), se usaron 20 explantes con 300 mL de medio líquido por RITA®, se realizaron 5 repeticiones. El programa de trabajo de los bioreactores fue de seis inmersiones diarias por 1 min, se incubaron por 16 semanas. Las condiciones de los dos tratamientos de cultivo fueron de 25 ± 2 °C, el fotoperiodo fue de 16 h diarias de luz y 8 h de oscuridad, se realizaron observaciones cada 15 días. A las 12 semanas se evaluó el porcentaje de explantes que formaron brotes.

Diseño experimental y análisis de datos

El experimento tuvo una distribución completamente al azar. Para cada condición se tuvieron cinco réplicas. Para el medio semisólido se utilizaron cinco explantes para cada concentración de BAP y para el medio líquido se utilizaron 20 explantes por RITA® y se realizaron cinco réplicas para cada condición. Los datos se sometieron a un análisis unidireccional de varianza (ANOVA) utilizando el programa InfoStat (Di et al., 2017, versión 2017 para Windows, <http://www.infostat.com.ar>). Las medias se compararon mediante la prueba de Duncan ($P \leq 0,05$).

Enraizamiento

Los brotes con un tamaño mayor a 5 cm en etapa de multiplicación fueron transferidos a un medio MS a la mitad de la fuerza suplementado con 1 mg L⁻¹ de ácido giberélico (GA3), 0.5 mg L⁻¹ ácido naftalenacético (NAA) y 2% de sacarosa. El pH se ajustó a 5.7 e incubados en un cuarto a 25 ± 2 °C, el fotoperiodo fue de 16 h diarias de luz y 8 h de oscuridad por 15 días.

Aclimatización

Cuando los explantes alcanzaron tamaños de 5 a 10 cm de longitud fueron transferidos a macetas que contenían sustrato comercial (Sushine MIX # 3) esterilizado en autoclave a 120 °C a 1 kg cm⁻² por 30 min, suplementado con tierra de invernadero en proporción 1:1. Las plántulas enraizadas se lavaron dos veces por 2 min con agua destilada, para eliminar el medio de cultivo.

Análisis de viabilidad económica

Con el fin de calcular la viabilidad económica de la Biofábrica, se determinaron los indicadores de Punto de Equilibrio, Relación Beneficio/Costo, el Valor Actual Neto (VAV) y la Tasa Interna de Retorno (TIR). Para el cálculo de estos indicadores se establecieron 210 RITA®, para un periodo de cinco años del proyecto y una tasa del 10%, los resultados se compararon con la producción de anturios bajo la vía de organogénesis directa en medios semisólidos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Multiplicación en medio semisólido

Las biofábricas como modelos de negocio de base tecnológica, requieren de procesos eficientes, económicos, con productos de alta calidad y de producción en menor tiempo. La micropropagación de plantas ha sido muy desarrollada principalmente con fines científicos, y cuando se requiere replicar estas metodologías en las biofábricas, se presenta el dilema "Eficiencia vs Rentabilidad" y es necesario tomar la información generada y establecer los procesos para las condiciones de trabajo de la biofábrica. Debido a ello es necesario comparar protocolos reportados, buscando utilizar la menor cantidad de hormonas vegetales sin afectar los índices de multiplicación y la calidad de las plantas.

En este trabajo iniciamos comparando tres concentraciones de 6-bencilaminopurina (BAP): 0.5, 1.0 y 2.0 mg L⁻¹ (Lee et al., 2003; Montes et al., 2004; Gantait et al., 2008; Liendo y Mogollón, 2009). Los parámetros de multiplicación y crecimiento se evaluaron a las 16 semanas. El Cuadro 1 nos muestra que se obtuvo un promedio de 3.8 brotes por explante, utilizando 2 mg L⁻¹ de BAP. Se observa que no existieron diferencias significativas entre 0.5 y 1 mg L⁻¹, lo que indica que el aumento de la concentración de BAP no es directamente proporcional a la tasa de multiplicación. Los datos presentados por Liendo y Mogollón (2009) muestran no tener diferencias significativas entre utilizar 1 o 2 mg L⁻¹ de BAP y tener un promedio de 4.1 brotes por explante. Lee et

al. (2003) utilizaron 0.2 y 0.8 mg L⁻¹ obteniendo 2.3 brotes por explante apoyando la evidencia de que la concentración de hormonas no es directamente proporcional a la tasa de multiplicación, pues a mayor cantidad de hormonas no aumentó la cantidad de brotes por explante. De hecho, a concentraciones mayores de 2 mg L⁻¹ de BAP hay una disminución en la tasa de formación de brotes. Cardoso y Haberman (2014)

utilizaron 1 mg L⁻¹ de BAP y obtuvieron un promedio de 2.8 brotes por explante. Gantait *et al.* (2008) utilizaron una mezcla de auxinas con el fin de aumentar la tasa de multiplicación, obteniendo en promedio 17.33 brotes por explante cuando utilizaron NAA y BAP (1.0 y 0.25 mg L⁻¹, respectivamente). Después de analizar los resultados obtenidos y comparar lo reportado por diversos autores, se recomienda utilizar 2 mg L⁻¹ de BAP, como base para la micropropagación utilizando medios gelificados de anturio.

Multiplicación en medio líquido-RITA®

Uno de los pasos cruciales para el establecimiento de las biofábricas, es el incremento en la tasa de multiplicación, en igual o menor tiempo de propagación y que no siempre se logra con los protocolos establecidos en medios gelificados. En la actualidad se utilizan principalmente Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) con el fin de aumentar la tasa de multiplicación, disminuir los costos de medios de cultivo, semiautomatizar los procesos y disminuir los costos de producción en general. En este trabajo utilizamos Recipientes de Inmersión Temporal Automatizados (RITA®) para el proceso de escalamiento al igual que lo realizan diversos autores en diferentes tipos de plantas (Etienne y Berthouly, 2002; Lara *et al.*, 2004; Morales *et al.*, 2014; Albany de Vilchez *et al.*, 2015;), entre otros. Basados en los resultados para medio semisólido, se utilizó 2 mg L⁻¹ de BAP para realizar el escalamiento a RITA®. Con ellos se obtuvo una tasa de multiplicación promedio de 24.2 brotes por explante, siendo 6.3 veces mayor la tasa de multiplicación que la del medio semisólido. En este trabajo demostramos que el utilizar Bioreactores RITA® aumenta la tasa de multiplicación. Estudios realizados por Teixeira *et al.* (2005) demuestran que la aereación en la micropropagación tiene un impacto positivo en la tasa de multiplicación y en la supervivencia a la aclimatación de las plantas.

Cuadro 1. Efecto de la concentración de 6-bencilaminopurina (BAP) en la proliferación de brotes de anturio usando medio semisólido.

Concentración (mg L ⁻¹)	Número promedio de brotes*
0.5	2.13b
1.0	2.27b
2.0	3.87a

*Medias seguidas de letras distintas indican diferencias estadísticas significativas (P≤0.05) de acuerdo a la prueba de Duncan.

Para el escalamiento de la propagación de las plantas se han utilizado diferentes tipos de SIT en distintas especies de plantas. Por ejemplo el Airlift en *Spathiphyllum cannifolium* (Dewir *et al.*, 2006); el SIT de frascos gemelos BIT en *Saintpaulia ionnata*, caña de azúcar y piña (Escalona *et al.*, 1999; Espinosa-Reyes *et al.*, 2007; Caamal y Bello, 2014); y el ORBITABION en *Agave tequilana* (Portillo y Santacruz 2006). Todos

estos sistemas se diseñaron para incrementar la tasa de multiplicación en la micropropagación de plantas de interés diverso. Lara *et al.* (2004) obtuvieron un coeficiente de multiplicación de 34 brotes en anturio utilizando 0.0089 mg L⁻¹ de BAP en un BIT modificado por Escalona *et al.* (1999), con una frecuencia de inmersiones de ocho veces al día por 3 min. Rivero-Bautista *et al.* (2004) reportan haber obtenido 25.5 brotes por explante utilizando un sistema BIT (Escalona *et al.*, 1999) con una frecuencia de seis inmersiones diarias. Lee *et al.* (2003) obtuvieron ocho brotes por explante con 0.8 mg L⁻¹ de BAP con agitación de 2/5 revoluciones cada 5 min. Martínez *et al.* (2019) reportaron 33.12 brotes por explante con inmersiones cada 12 h en 45 días utilizando un Bioreactor Ebb and flow biorreactor system. Morales *et al.* (2014) obtuvieron 43 brotes por explante utilizando 3 mg L⁻¹ en un sistema RITA® con seis inmersiones diarias.

Si bien existen varios reportes en donde se obtienen diversas tasas de multiplicación utilizando diversos tipos de SIT, el trabajo que presentamos se encuentra dentro de los rangos de multiplicación, al utilizar SIT existen una serie de factores que influyen sobre la tasa de multiplicación como es el tipo de bioreactor utilizado, la frecuencia y tiempo de inmersión, la concentración de hormonas, la variedad de planta, la intensidad lumínica, entre muchos otros factores que pueden potencializar o disminuir la tasa de multiplicación. Martínez *et al.* (2019) probaron 4, 8 y 12 h de inmersión y 25, 37.5 y 50 mL de medio de cultivo, reportaron que para anturio no existen diferencias estadísticas significativas entre tratamientos. De acuerdo con Estrada *et al.* (2019) se podría utilizar una cantidad baja de medio de cultivo y una frecuencia de inmersión menor a la planteada en este trabajo.

Es importante resaltar un aumento importante en la tasa de multiplicación por SITs comparado con el

sistema de medio semisólido. En la Figura 1A y 1B podemos observar las diferencias mencionadas en este trabajo, evidenciado como una mayor tasa de multiplicación. Otro parámetro a evaluar en el escalamiento en la tasa de multiplicación es la calidad de las plántulas micropropagadas. En la Figura 1C y 1D se observa que las plántulas micropropagadas en medios semisólidos presentan un amarillamiento de la hojas, mientras que en las micropropagadas bajo el sistema RITA[®] no presenta este amarillamiento. Otro punto a resaltar por la utilización de RITA[®] es la mayor tasa de enraizamiento y la tasa de sobrevivencia al momento de la aclimatación (Figura 1E, 1F).

Análisis de viabilidad económica para una biofábrica con biorreactores RITA[®]

En este trabajo se definieron los indicadores financieros con un proyecto de inversión en donde no se contempla apoyo gubernamental. El recurso total se consideró como inversión privada. Para iniciar las operaciones de la biofábrica se requiere una inversión inicial de MX\$ 1,776,063.38, equivalentes a US\$ 92,744.82 (a tasa de cambio de \$19.15 pesos mexicanos por dólar, 17/05/19, BANXICO). Sin considerar la construcción de las instalaciones de la biofábrica, solo el equipamiento, materiales y reactivos requeridos para el establecimiento de la biofábrica, la inversión fija estimada es de MX\$ 1,026,833.25 (US\$ 53,620.54), una inversión diferida de MEX \$50,000.00 pesos mexicanos (US\$ 2,610.97), la cual se atribuye a capacitación especializada sobre la operación de los SIT, en específico el RITA[®] y un capital de trabajo de MX\$ 699,230.13 (US\$ 36,513.32). Se espera que el primer año se tenga una producción de 100,000 plántulas, y ventas por MX\$ 2,200,000.00 (US\$ 114,882.51), estabilizándose el tercer año con una proyección de ingresos de MX\$ 2,425,500.00 (US\$ 126,657.96), con una producción de 100,000 plántulas. El punto de equilibrio se estabilizó al tercer año con un valor de MX\$ 702,913.66 (US\$ 36,705.67) que equivale al 29% o 100,000 plántulas. En el Cuadro 2

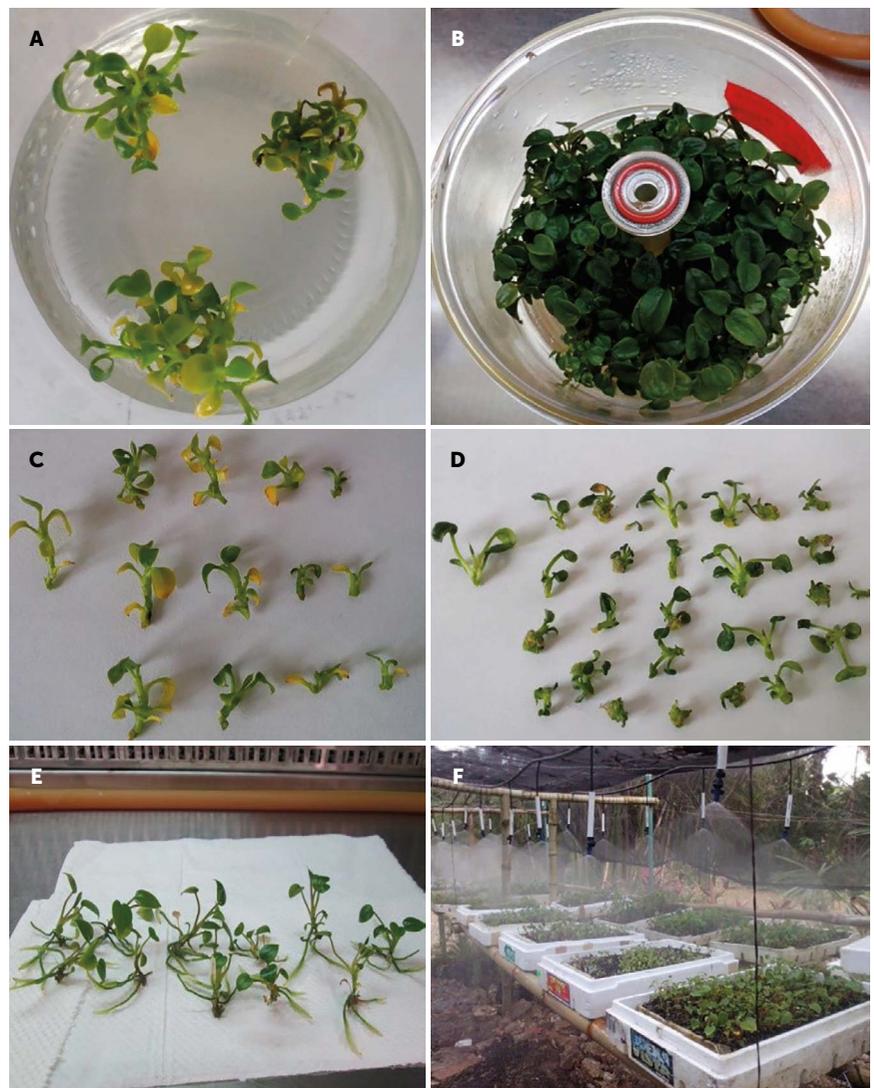


Figura 1. Micropropagación de anturio (*Anthurium andeanum*). A) Brotes multiplicados en medio semisolido. B) Brotes multiplicados en medio líquido (RITA[®]). C) Brotes multiplicados en medio semisolido de 90 d de incubación. D) Brotes multiplicados en medio líquido de 90 d de incubación. E) Representación de la cantidad de brotes con raíces en el sistema RITA[®]. F) Explantes provenientes del sistema RITA[®] en proceso de aclimatación en invernadero a un 30% de sombra.

se presenta la memoria de cálculo utilizada para definir los indicadores financieros presentados en este trabajo.

Con los datos anteriores se calcularon los indicadores financieros, y se obtuvo un Valor Actual Neto (VAN) de MX\$ 2,513,056.14 (US\$ 131,230.08) y una Tasa Interna de Retorno (TIR) del 73.64 %, con una Relación Beneficio Costo (RBC) de 1.67, todo calculado a una tasa de interés del 10% y teniendo un periodo de análisis de tres años. Con los datos anteriores podemos mencionar que una biofábrica con 210 RITA[®] es rentable, considerando con la capacidad instalada a partir del tercer ciclo de producción ya tendríamos las 100,000 plántulas y podríamos aumentar la tasa de multiplicación a aproximadamente

Cuadro 2. Memoria de cálculo para obtener indicadores financieros para el análisis de la rentabilidad de una biofábrica de anturio.

Memorias de cálculo				
CONCEPTO	UNIDAD DE MEDIDA	CANTIDAD	PRECIO UNITARIO	TOTAL
Reactivos para propagación	LOTE	1	\$64,000.95	64,000.95
Materiales de laboratorio (pinzas, probetas, etc.)	LOTE	1	\$24,824.00	24,824.00
Consumibles (Filos de bisturí, Gas LP, etc.)	LOTE	1	\$17,500.00	17,500.00
Frascos (250 mL) con tapa de plástico	UNIDADES	5000	\$10.00	50,000.00
TOTAL				156,324.95
OTROS EGRESOS			COSTO	
Mantenimiento de instalaciones			60,000.00	
Gastos de administración y venta			120,000.00	
Mano de obra			412,260.20	
RENDIMIENTO Y PRECIO DE VENTA:			TOTAL	
Tasa de multiplicación (brotes/explante)			100,000.00	
Precio (\$/maceta 30 cm) anturio			22.00	

390,000 plántulas al año, si el mercado así lo demanda, por lo que con este modelo solo se utiliza un 25% de la capacidad instalada.

CONCLUSIÓN

Una biofábrica para la producción de anturios como la que se propone en este trabajo, utilizando 210 RITA® como estrategia para aumentar la rentabilidad y disminuir los costos de producción, promete ser completamente rentable utilizando una proporción de 2 mg L⁻¹ de BAP, para la etapa de multiplicación. Sin embargo, se recomienda utilizar otro tipo de SIT debido a que gran parte de la inversión inicial se debe al costo del SIT, aunado a que se puede aumentar la tasa de multiplicación, como lo demuestra Estrada *et al.* (2019). Como recomendación se propone el SIT de frascos gemelos reportado por Escalona *et al.* (1999), lo cual disminuye los costos de la inversión en más de un 10%. También queda de manifiesto el hecho de que, la biotecnología se hace más rentable cada día y con el uso de energías alternas los costos de producción pueden disminuir aún más. En la actualidad el uso de la iluminación con diodos emisores de luz (LED), aires acondicionados y refrigeradores inverter pueden disminuir los costos sobre el consumo de energía eléctrica.

AGRADECIMIENTOS

A la LGAC "Innovación para el desarrollo del trópico" dentro del programa Bioprospección y sustentabilidad agrícola en el trópico, por el recurso otorgado para la realización de este trabajo.

LITERATURA CITADA

Albany-Vilchez, N. R., Vilchez-Perozo, J. A., León-Sierralta, S., Nava-Ferreira, A. R., Martínez-Ferrer, L. J., Molina-Pulgar, M. A. (2015) Medios de cultivo líquidos: un avance para la micropropagación de zábila *Aloe barbadensis* Mill. Revista Colombiana de Biotecnología. 17(1): 24-31. DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.50669

Atak, Ç. and Çelik, Özge. (2009) Micropropagation of *Anthurium andraeanum* from leaf explants. Pakistán Journal of Botany, 41(3): 1155-1161. Recuperado el 27 mayo de 2019, de [http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/41\(3\)/PJB41\(3\)1155.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/41(3)/PJB41(3)1155.pdf)

Bello-Bello, J. J., Cruz-Cruz, C. A. y Pérez-Guerra, J. C. (2019) A new temporary immersion system for commercial micropropagation of banana (*Musa* AAA cv. Grand Naine). In *Vitro cellular & developmental Biology-plant*. DOI: <http://doi.org/10.1007/s11627-019-09973-7>.

Caamal-Velázquez J. H., Bello-Bello J. J. (2014) Manual de micropropagación de caña de azúcar (*Saccharum* spp.). Colegio de Postgraduados/Fundación Produce Campeche 24 pp. ISBN: 978-607-715-210-1

Cardoso J. C., Habermann G. (2014) Adventitious shoot induction from Leaf segments in *Anthurium andraeanum* is affected by age of explant, leaf orientation and plant growth regulator. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 55 (1): 56-62. DOI <https://doi.org/10.1007/s13580-014-0022-9>

Dewir Y. H., Chakrabarty D., Hahn E. J., Paek K. Y. (2006) A simple method for mass propagation of *Spathiphyllum cannifolium* using an airlift bioreactor. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 42:291–297. DOI <https://doi.org/10.1079/IVP2006764>

Di-Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., González L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

Escalona M., Lorenzo J. C., González B., Daquinta M., González-Olmedo J., Desjardins Y., Borroto C. G. (1999) Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary

- immersion systems. *Plant Cell Reports*, 18:743-748. DOI <https://doi.org/10.1007/s002990050653>
- Espinosa-Reyes A., Silva-Pupo J., Gonzáles-Paneque O., Fajardo-Rosabal L., Pérez- Pérez J. (2007) Multiplicación *in vitro* de Violeta Africana. *Revista Electrónica Granma Ciencia*. Vol.11, No.2. Departamento de Ciencias Básicas. Facultad de Ingeniería. Universidad de Granma. Cuba
- Etienne H., Berthouly M. (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3), 215-231. Disponible en http://www.grciencia.granma.inf.cu/vol11/2/2007_11_n2.a8.pdf
- Gantait S., Mandal N., Bhattacharyya S., Das P. K. (2008) *In vitro* Mass Multiplication with Pure Genetic Identity in *Anthurium andreaeanum* Lind. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 18(2): 113-122. D.O.I. 10.3329/ptcb.v18i2.3361
- Georgiev-Vasil, Schumann-Anika, Pavlov-Atanas, Bley-Thomas (2014) Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in Life Sciences*, 14: 607-621. <https://doi.org/10.1002/elsc.201300166>
- Hernández L. (2004) El cultivo de anturium. *Cultivos Tropicales*. 25(4): 41-51. Disponible en <http://www.redalyc.org/pdf/1932/193225911004.pdf>
- Hernández-Soto A., Gatica-Arias A., Alvarenga-Venutolo S. (2008) Vaso fermentador de bajo costo para la micropropagación masiva de jengibre. *Agronomía Mesoamericana*. 19(1): 87-92. Disponible en: <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agromeso/article/view/5025/4832>
- Lara A., Mosqueda O. y González-Olmedo. (2004) Determinación de los efectos del Pectimorf y C-751 sobre la multiplicación de brotes de *Anthurium andreaeanum* Propagadas en Bioreactores de Inmersión Temporal. *Ceiba* 45(2) Pp. 121-128. Disponible en <https://revistas.zamorano.edu/index.php/CEIBA/article/view/370>
- Lee-Espinosa H., E., Cruz-Castillo J. G., García-Rosas B. (2003) Multiple shoot Proliferación and Acclimation of 'Midori' y 'Kalapana' anturium (*Anthurium andreaeanum* L.) Cultured *in vitro*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 26 (4): 301 – 307. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61026412>
- Liendo M., Mogollón N. (2009) Multiplicación clonal *in vitro* de anturio (*Anthurium andreaeanum* lind. Cv. Nicoya) *Bioagro* 21 (3): 179-182. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85714207005>
- López-Puc G., Ramírez-Mosqueda M. A., y Lee-Espinosa H. E. (2013) El cultivo del anturio moderno. *Ciencia* 64(3):52-59. Disponible en: https://www.amc.edu.mx/revistaciencia/images/revista/64_3/PDF/Anturio.pdf
- Marques-Pinheiro M. V., Bolzan-Martins F., Ferreira-Cruz A. C., Portugal-Pinto C., Ana-Cristina, Jardim-Oliveira E., and Campos-Otoni W. 2014. Somatic embryogenesis in anthurium (*Anthurium andraeanum* cv. Eidibel) as affected by different explants. *Acta Scientiarum*, 36 (1): 87-98. Doi: 10.4025/actasciagron.v36i1.16557
- Martínez-Estrada E., Islas-Luna B., Pérez-Sato J. A., Bello-Bello J. J. (2019) Temporary immersion improves *in vitro* multiplication and acclimatization of *Anthurium andreaeanum* Lind. *Scientia Horticulturae* Vol 249. Pp 185-191. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.01.053>
- Martínez-Estrada E., Caamal-Velázquez J. H., Morales-Ramos V. and Bello-Bello J. J. (2016) Light emitting diodes improve *in vitro* shoot multiplication and growth of *Anthurium andreaeanum* LIND. *Propagation of Ornamental Plants*. Vol. 16, - 1, 3-8. Disponible en: https://www.journal-pop.org/2016_16_1_3-8.html
- Morales-Orellana R. J., Jadan M., Romero P. (2014) Micropropagación de Anturio (*Anthurium andreaeanum* L.) en un sistema de inmersión temporal mediante organogénesis indirecta a partir de secciones de hoja. *Carrera de Ingeniería en Biotecnología*. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Sede Sangolquí. Disponible en: <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/7704/1/AC-B-ESPE-047633.pdf>
- Montes S., Morales C., Bell E. (2004) Regeneración de plantas de *Anthurium andreaeanum* Lind mediante el empleo del cultivo *in vitro*. *Cultivos tropicales*. 25(3): 5-7. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193217916001>
- Murashige, y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiología Plantarum*, 15: 473-497.
- Murillo-Gómez P. A., Naranjo-Esther, Callejas-Ricardo, Atehortúa-Lucia y Urrea Aura. (2014) Micropropagation of the native species *Anthurium antioquiense* Engl. for conservation purposes. *Agronomía colombiana* 32(3): 334-340. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180333786005>
- Portillo L., Santacruz-Ruvalcaba F. (2006) Factibilidad de uso de un nuevo sistema de inmersión temporal (Orbitabion®) para embriogénesis somática de *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *Boletín Nakari* 17(2): 43-48 (edición digital). ISSN: 1405-1613. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Liberato_Portillo/publication/280078674_FACTIBILIDAD_DE_USO_DE_UN_NUEVO_SISTEMA_DE_INMERSION_TEMPORAL_ORBITABIONR_PARA_EMBRIOGENESIS_SOMATICA_DE_Agave_tequilana_WEBER_CULTIVAR_AZUL/links/55a6a6af08ae410caa74eb0e/FACTIBILIDAD-DE-USO-DE-UN-NUEVO-SISTEMA-DE-INMERSION-TEMPORAL-ORBITABIONR-PARA-EMBRIOGENESIS-SOMATICA-DE-Agave-tequilana-WEBER-CULTIVAR-AZUL.pdf
- Prakash S., Hoque M., Brinks T. (2004) Culture media and containers, En *Low cost options for tissue culture technology in developing countries*. Proceedings of a Technical Meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture (pp. 29-40). Disponible en: https://www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/te_1384_web.pdf
- Rivero-Bautista N., Quiala E., Agramante D., Barbón R., Camacho W., Morejón L., Pérez M. (2004) Empleo de sistemas de inmersión temporal para la multiplicación *in vitro* de brotes de *Anthurium andraeanum* Lind. *Var. Lambada*. *Biotecnología Vegetal* 4 (2): 97-100. Disponible en: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/393/html>
- Teixeira-Silva J. A., Nagae S., Tanaka M. (2005) Effect of physical factors on micropropagation of *Anthurium andreaeanum*. *Plant tissue culture* 15 (1): 1-6. Disponible en: http://baptcb.org/article/ptc15_1_01.pdf
- Welander M., Persson J., Asp H., Zhu L.H. (2014). Evaluation of a new vessel system based on temporary immersion system for micropropagation. *Scientia Horticulturae* 179: 227-232. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2014.09.035>