ORGANOGENESIS DIRECTA EN MEDIO LÍQUIDO EN CLAVEL EN UN BIOREACTOR DE BAJO COSTO.

DIRECT ORGANOGENESIS ON LIQUID MEDIA IN CARNATION INTO BIOREACTOR OF LOW COST

Ingrid Elizabeth Monroy Álvarez[1]
Juan José Filgueira Duarte[1,2]

Fecha de recepción: 18 de febrero de 2010
Fecha de aceptación: 18 de abril de 2010

1 Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad Militar Nueva Granada
2 Autor para correspondencia: juan.filgueira@unimilitar.edu.co

RESUMEN

El desarrollo de los sistemas de inmersión temporal pueden proveer un medio rápido y eficiente para la micropropagación de plantas en condiciones *in Vitro*, por medio de la inducción de organogénesis directa en medio líquido; sin embargo, el alto costo de los sistemas comerciales desarrollados para tal fin, como lo es caso de sistema RITA®, ha limitado su uso. Por este motivo, se plantearon como objetivos en esta investigación; uno, desarrollar técnicas de organogénesis directa para adaptarlas al sistema de birreactor, evaluando la variación del potencial organogénico de dos variedades comerciales con diferentes reguladores de crecimiento y bajo diferentes grados de gelificación del medio; y dos, diseñar un sistema prototipo de biorreactor de inmersión temporal de bajo costo para la micropropagación de clavel (*Dianthus caryophyllus*). Así, se diseñó y construyó un sistema prototipo de inmersión temporal con insumos nacionales, demostrándose con esto que es posible tener un sistema de bajo costo en el cual se lograron mantener condiciones totales de asepsia, además de demostrar ser un sistema fácil de manipular y que puede escalarse con facilidad. En cuanto a la inducción de organogénesis directa se quería evaluar la adaptabilidad de dos variedad diferentes de clavel comercial, como ejemplo, al sistema, se encontraron diferencias en la respuesta morfogénica a nivel varietal; la variedad Kaly (comercial), resulto ser más eficiente bajo la influencia hormonal de tidiazuron (TDZ), a una concentración de 0.05 mg/l en medio líquido; factor que indica que la producción de brotes organogénicos dentro del sistema de inmersión temporal usando medio de cultivo líquido es altamente viable.

Palabras clave: Sistema de inmersión temporal, organogénesis directa, clavel, Tidiazuron.

ABSTRACT

The development of immersion temporal systems, could provided a quickly and efficient method of plant micropropagation in *in Vitro* conditions, by induction of direct organogenesis on liquid media. However, the cost of the commercial systems like how the RITA® system has limited it used. The objective of this work, was to design a low cost bioreactor prototype, for micropropagation of carnation, applying direct organogenesis on commercial varieties, evaluating the potential of organogenenic variation with different grow regulators and gel concentration. So, we design and construct a systems of temporal immersion with not expensive elements, into of this bioreactor we maintained aseptical condition of propagation. The organogenesis induction shows differences on responds of different varieties of carnation, the Kaly variety was the most efficient in propagation with hormone tidiazuron (TDZ) 0.05 mg/l on liquid media. We demonstrate that using a low cost bioreactor of temporal immersion we can micropropagate commercial carnation.

Key words: Temporal immersion system, direct organogenesis, carnation, Tidiazuron.

INTRODUCCIÓN

Las técnicas de micropropagación de clavel han contribuido a mejorar las características agronómicas y la calidad de los esquejes que se utilizan en la siembra y también han sido útiles para obtener variación somaclonal, principalmente

mediante métodos como organogénesis y embriogénesis somática (Roca, 1991).

Por otro lado, la aplicación a escala comercial de estas técnicas se ha visto limitada por factores tales como las bajas tasas de multiplicación, calidad de los explantes y altos costos ocasionados por el uso intensivo de mano de obra en las etapas de multiplicación y enraizamiento (Castro *et al*, 2002).

Es por esto, que la automatización de una, o más etapas de los procesos de micropropagación es una opción para la reducción de costos de manipulación, reducción del espacio e incremento de volúmenes de producción (Aharoni, 2002). Los biorreactores pueden proveer un sistema rápido y eficiente para la micropropagación de plantas por medio de la aplicación de técnicas de cultivo *in Vitro*, tales como la inducción de organogénesis directa en medio líquido (Colmenares y Giménez, 2005). Las ventajas que presenta este sistema sobre el cultivo en medios semisolidos son entre otras, mejor manejo sobre las condiciones del cultivo, contacto directo del explante con el medio de cultivo y un óptimo y continuo suplemento de reguladores de crecimiento y nutrientes a los explantes (Ziv, 2000 y 2002, Albarran, *et al*., 2005, Snyman, *et al*., 2007).

Es por esto que además de poner especial atención sobre el hallazgo de nuevas variedades de clavel comercial con características comerciales atractivas y resistentes a parásitos vasculares objetivo principal de nuestro grupo de trabajo, es importante y oportuno desarrollar las diferentes técnicas de propagación en sistemas que permitan la propagación masiva de variedades de clavel de cultivo comercial, haciendo estas labores más eficientes en cuanto a la obtención de tasas de producción más elevadas y rápidas por medio de la construcción y adaptación de un sistema de inmersión temporal de bajo costo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Como material vegetal se utilizaron cortes internodales de las variedades Kaly y Bagatel de clavel estándar comercial, el material fue donando por una empresa propagadora para este trabajo. Para la propagación del material vegetal en condiciones in Vitro y la evaluación de los ensayos, el material ex Vitro se desinfecto con etano al 70% un minuto, hipoclorito de sodio 5% un minuto y dos lavados con agua destilada esteril, se estrageron los meristemos y se cultivaron en medio MS 4.4 g/l Sigma® 4419 (Murashige y Skoog, 1962), 30 g/l de sacarosa y pH de 5.8, suplementado con deferentes reguladores de crecimiento según fuera el caso.

Evaluación de la respuesta a inducción de organogénesis directa a diferentes grados de solidificación del medio, usando diferentes reguladores de crecimiento sobre las variedades Kaly y Bagatel.

Para inducir organogénesis directa, se llevaron a cabo diferentes ensayos que consistieron en usar medio base MS 4.4 g/l, 30 g/l de sacarosa, un pH de 5.8, y un fotoperiodo de 16 horas/luz, y 6000 lux de intensidad lumínica, evaluando la combinación de diferentes hormonas (auxinas y citokininas), (Tabla 1), variando el grado de solidificación del medio desde 8 g/l hasta 0 g/l de agar. Como control, se cultivaron los explantes en medio MS sin hormonas bajo los diferentes grados de solidificación del medio. Los ensayos con una concentración de agar-agar

Sigma® entre 2 y 8 g/l se realizaron en frascos de compota con tapa magenta, con aproximadamente 25ml de medio por frasco, en los que se disponían 4 explantes o cortes internodales verticalmente sobre el medio. Los ensayos evaluados en medio líquido, se realizaron en Elermeyers, con gasa en el fondo del frasco, para simular un medio de sostenimiento de los explantes y 100ml de medio con hormona(s) por Elermeyer. Los explantes fueron evaluados de 8 a 16 semanas después de ser expuestos a cada una de las concentraciones hormonales.

No. Ensayo	ANA	TDZ	BAP	Agar g/l
1		0.05		0
2		0.50		2
3	0.30		0.30	4
4	0.10		0.30	6
5	4.00		2.00	8
6	4.00		4.00	8

Tabla1. Ensayos con hormonas (mg/l), para inducción de organogénesis directa, evaluados a diferentes concentraciones de agar (g/l). ANA (1-ácido naftalenoacético), TDZ (tidiazuron), BAP (6-benzilaminopurina), todas las hormonas marca Sigma®.

Para cada variedad de clavel y tipo de ensayo con hormonas y concentración de agar, los parámetros evaluados fueron: número de brotes producidos con organogénesis directa contra el número de explantes sembrados, número total de brotes organogénicos directos obtenidos por ensayo contra el numeró de explantes sembrados y número de explantes muertos sin multiplicación.

Se manejaron dos variedades de clavel comercial (Kaly y Bagatel), que fueron escogidas por su importancia en el cultivo comercial del clavel, se sometieron a seis concentraciones hormonales diferentes (Tabla 1), se evaluaron cinco concentraciones diferentes de agar (Tabla 1), Cada ensayo se repitió 4 veces con 10 explantes o cortes internodales cada uno; para un total de 1200 unidades de evaluación.

A los datos obtenidos se les hizo un análisis estadístico ANOVA, para comparar los tratamientos y las diferencias entre ellos, en caso de diferencias significativas se realizaron pruebas de Tukey, por medio del programa estadístico R, con un valor de $P = 0.05$.

Construcción de un sistema biorreactor de inmersión temporal de bajo costo

Debido al alto costo de los recipientes comerciales para inmersión temporal automatizada, como los RITA®, se construyó este sistema prototipo, elaborado con materiales que pueden encontrarse en el mercado nacional y que según lo reportado en trabajos como los de Giménez y Colmenares (2004) y Rosales y colaboradores (2003), pueden tener la misma eficiencia que los sistemas que se venden comercialmente.

Para la construcción del sistema de inmersión temporal, se requirió de dos temporizadores Luminex® Tap-021, dos válvulas solenoides MEAC® L120V02 (electroválvulas), dos bombas de aire OTTO® airpumpSA3500, filtros microporo de 2mm Fisherbrand®, racores ó conectores de nylon de ¼" Fisherbrand®, mangueras de silicona de ¼" resistentes a altas temperaturas Nalgene® para permitir su esterilización en autoclave, dos recipientes de vidrio translúcidos de 5 litros de capacidad, y dos tapones de caucho ajustables que fueron perforados para abrir tres orificios en cada uno de los tapones de 5 mm, en los cuales se introdujeron 3 tubos de vidrio, uno de ellos hasta el fondo del recipiente, que sirve para interconectar los frascos mediante mangueras de silicona y poder de esta manera hacer el intercambio

de medio de un frasco al otro, el otro tubo se introdujo hasta la mitad del frasco, este corresponde a la entrada de aire, que es esterilizado por filtración, en el tercer orificio se introdujo un tubo de vidrio hasta que quedó a ras de la parte inferior del tapón, este esta conectado a una válvula solenoide que tiene como función permitir un pequeño escape de aire, lo cual permite liberar presión acumulada dentro del sistema (Fig. 1).

Según el tiempo programado en el temporizador, se acciona este y se abre una de las bombas de aire, permitiendo que el aire proveniente de la bomba impulse el medio de cultivo hacia el frasco que contiene los explantes; al mismo tiempo, se abre una válvula solenoide permitiendo un pequeño escape de aire, lo cual permite liberar presión acumulada dentro del sistema (Fig. 1).

Estos procesos ocurren primero en el frasco que contiene el medio y luego se encienden el temporizador y la válvula conectados al frasco que contiene los explantes, permitiendo que el medio de cultivo retorne al recipiente inicial. Las condiciones de esterilidad se logran mediante el empleo de filtros microporo de 0.2 µm y la previa esterilización de todos los componentes del biorreactor que tienen contacto con el medio de cultivo.

Durante el período de inmersión, el flujo de aire permite el burbujeo del medio, remueve los explantes y cambia la atmósfera dentro del recipiente de cultivo. Pasado el tiempo de inmersión, se activan la segunda bomba de aire y se abre la segunda válvula por medio del segundo temporizador y se regresa el medio al recipiente de almacenamiento.

Para el control del tiempo de inmersión y la frecuencia de los ciclos de inmersión en este sistema biorreactor de doble envase, se logra con la sincronización de los dos temporizadores programables. El sistema fue construido en

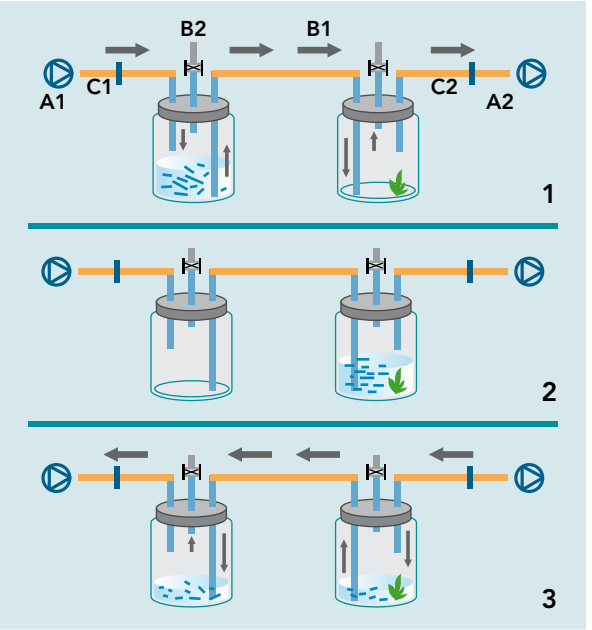


Figura 1. Diseño del biorreactor y descripción del funcionamiento del sistema: 1) El temporizado uno abre la válvula solenoide B1 y la presión de aire proveniente de la bomba A1 impulsa el medio de cultivo al frasco que contiene las plantas; 2) Tiempo de inmersión; 3) Después de un período de tiempo seleccionado, el segundo temporizador abre la válvula B2 y la bomba de aire A2, regresando el medio de cultivo al frasco reservorio de medio. A Bomba de aire B Válvula solenoide C Filtros. El recuadro rojo, indica que la válvula solenoide esta abierta, permitiendo la liberación de presión dentro del frasco, mientras que la otra válvula esta cerrada.

total con componentes, que se pueden encontrar en el comercio nacional, con excepción de los filtros, que son importados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de la respuesta a inducción de organogénesis directa a diferentes grados de solidificación del medio, usando diferentes reguladores de crecimiento, sobre las variedades Kaly y Bagatel.

El análisis de varianza de los datos experimentales mostró que, el potencial organogénico, varia con la variedad de clavel utilizada en los experimentos y dependiendo de la concentración

y tipo de reguladores de crecimiento utilizados y aun mas varían con la concentración de agar en el medio de cultivo, estas variaciones se presentan en todos los casos analizados en la bibliografía para clavel (para revisión consultar Frey y Janick, 1991 y Sanhkala *et al*, 1995). En general, se pudo observar una mejor respuesta organogénica directa por parte de la variedad Kaly que por parte de la variedad Bagatel, en especial en cuanto al número de brotes obtenidos (Tabla 2). Por otro lado, en cuanto al número de explantes muertos, se observó, que este parámetro siempre fue mayor sobre la variedad Bagatel, en los tratamientos hormonales 6 y 5 y las concentraciones de agar por litro de 2 y 8 gramos (Tabla 2).

Al realizar los análisis de varianza, del número de explantes con organogénesis directa, frente a las variedades y tratamientos hormonales, se encontró que los datos, muestran diferencias altamente significativas (Tabla2), como es de esperar en este tipo de especies vegetales y lo discute previamente Krikorian (1991), para diferentes variedades de clavel.

Igualmente, se pudo observar que los mejores tratamientos hormonales para obtener una respuesta organogénica óptima en su orden son: el tratamiento 1, 4 y 2. Por otro lado, se encontró, que las mejores concentraciones de agar, para obtener una óptima respuesta en cuanto al número de brotes producidos, son de 0 y 6 g/l (Tabla 2). Los análisis de varianza sobre el número total de brotes organogénicos, arrojaron diferencias significativas entre las variedades y los tratamientos hormonales pero no entre los diferentes grados de solidificación del medio.

Al realizar las pruebas de Tukey, se pudo ver que la mejor respuesta en términos del número total de brotes organogénicos, se dio por parte de la variedad Kaly; además, que los tratamientos en donde se obtuvo mayor número de brotes organogénicos directos, en su orden fueron el tratamiento 2, 1, 3 y 4 (Tabla 2).

Con base en los resultados, se pudo evidenciar que, la regeneración de brotes organogénicos depende de las características genéticas de los explantes, factor relacionado con el balance de la concentración de los reguladores de crecimiento en el medio (TDZ, ANA, BAP), como fue descrito por Frey y Janick, 1991. Sin embargo, al igual que el reporte hecho por Onamu y colaboradores en el 2003, así como los reguladores de crecimiento pueden inducir procesos de morfogénesis en el tejido, también pueden resultar en una respuesta inhibitoria de dicho proceso, además de influenciar las características físicas de los brotes obtenidos, hecho que se evidenció en este trabajo, por parte de la respuesta inhibitoria presentada en los tratamientos hormonales 5 y 6 donde se presentó la muerte de todos los explantes y en los tratamientos con TDZ, donde a pesar de reportar una alta producción de brotes organogénicos, estos presentaban anomalías morfológicas como enanismo, albinismo, arosetamiento, etc.

Las diferentes respuestas morfogénicas obtenidas por cada variedad, pueden deberse a que aunque las dos variedades evaluadas, pertenezcan a la misma especie y sean genéticamente similares, las respuesta de cada una, puede estar influenciada por elementos genéticos transponibles que al expresarse prendiendo o apando genes, pueden modificar directa o indirectamente las concentraciones hormonales endógenas, así como la sensibilidad de los explantes a los reguladores de crecimiento exógenos, lo cual puede variar la capacidad morfogénica de las variedades, como lo reportó Cassanova (2004).

Tratamiento con Hormonas, Concentración en mg/l	No. Explantes con Organogénesis Directa	No. Total de Brotes Organogénicos Directos	No. Explantes Muertos
TDZ 0.05	**3.45 +/- 0.48 K**	**124.15 +/- 23.76 B**	5.12 +/- 0.48 K
TDZ 0.5	2.40 +/- 0.30 KB	**167.60 +/- 45.73 K**	6.60 +/- 0.36 B
ANA 0.3 BAP 0.3	2.30 +/- 0.39 KB	66.87 +/- 11.69 K	6.12 +/- 0.36 KB
ANA 0.1 BAP 0.3	2.43 +/- 0.37 KB	56.37 +/- 10.22 B	6.40 +/- 0.45 B
ANA 4.0 BAP 2.0	1.27 +/- 0.34 K	44.50 +/- 12.360 K	**8.12 +/- 0.39 K**
ANA 4.0 BAP 4.0	1.42 +/- 0.37 KB	51.27+/- 13.00 K	**8.27 +/- 0.39 K**
Concentración de Agar por Litro (g/l)	**No. Explantes con Organogénesis Directa**	**No. Total de Brotes Organogénicos Directos por explante**	**No. Explantes Muertos**
0	**3.77 +/- 0.44 K**	79.95 +/- 12.82 K	5.52 +/- 0.44 B
2	1.27 +/- 0.25 B	38.45 +/- 10.50 K	**7.41 +/- 0.36 K**
4	1.83 +/- 0.27 B	**134.83 +/- 37.44 K**	6.97 +/- 0.38 KB
6	2.29 +/- 0.31 KB	117.25 +/- 22.47 B	7.02 +/- 0.37 KB
8	1.80 +/- 0.40 B	54.90 +/- 11.70 B	7.05 +/- 0.41 KB

Tabla 2. Resultados de análisis de varianza para las dos variedades evaluadas Bagatel (B) y Kaly (K), de acuerdo a los tratamientos de concentraciones hormonales (parte superior de la tabla) y de concentración de agar (parte inferior de la tabla). En negrita resultados más significativos (Anava, $P< 0.05$), de acuerdo con la prueba de Tukey realizada. Solo se muestra el resultado superior en la comparación del comportamiento de la variedad Bagatel (B) y la variedad Kaly (K), si son iguales los valores aparecen KB.

Por otro lado, la mayor respuesta morfogénica de los explantes de las dos variedades (Kaly y Bagatel), bajo el regulador hormonal TDZ, puede deberse a que la exposición continua de los explantes a concentraciones de TDZ, tiene efectos significativos sobre el número de brotes organogénicos, su tamaño y calidad, como lo menciona Onamu y colaboradores (2003); así, aunque bajo estos tratamientos (TDZ 0.05 y TDZ 0.5 mg/l), se obtuvieron los mayores números de brotes por explante, su tamaño y calidad no fueron los mejores, debido a alteraciones morfológicas, como enanismo, malformación de tejidos, y vitrificación, entre otros.

En cuanto al grado de solidificación del medio, este más que tener un efecto sobre la cantidad de brotes organogénicos producidos, afecta principalmente el desarrollo y la fisiología normal de los explantes y brotes, fenómeno denominado hipehidricidad, que se produjo principalmente sobre los ensayos con una concentración de agar de 0 y 4 g/l, resultados que concuerdan con lo reportados por Cassanova y colaboradores en el 2004, y Ziv en el 2000.

Construcción del biorreactor de inmersión temporal

El sistema biorreactor fue construido, con materiales que se encuentran en el mercado nacional, resistentes a altas temperaturas, lo que les permite resistir varios ciclos de autoclavado. El biorreactor en su totalidad, debe ser armado en la cámara de flujo, para evitar así contaminación del medio ó de los explantes contenidos en este (Fig. 2).

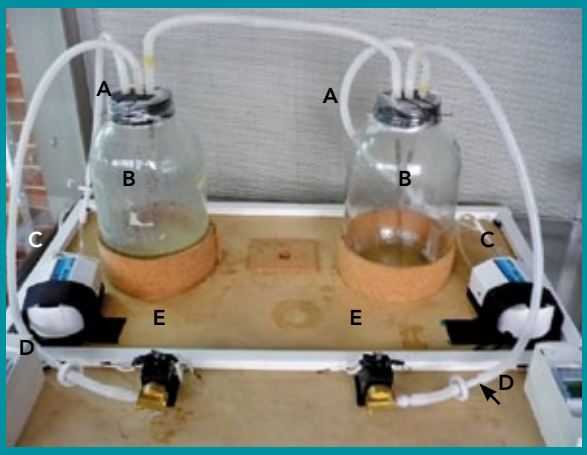
Las tapas del biorreactor (Fig. 3), como se manifestó en la metodología, son de caucho, ajustables, y tienen tres orificios, en los cuales se dispusieron 3 tubos de vidrio (en su defecto pipetas de 2 y 5ml de vidrio), conectados a sus respectivas mangueras de silicona; todos estos

componentes, se ajustaron de manera tal, que conforman una sola pieza; esto con el fin de facilitar el proceso de autoclavado y la construcción del biorreactor como tal. Adicionalmente, además de ajustar las tapas al frasco, se elaboró un cierre hermético, con alambre, para asegurarlas y eliminar posibles fuentes de contaminación por entrada ó salida de aire.

Para poner en funcionamiento el biorreactor, y controlar los ciclos de encendido y apagado de las bombas de aire y las válvulas solenoides, estos debieron ser conectados a los temporizadores, lo que en últimas van ha controlar la entrada de aire y la apertura de las válvulas en un tiempo previamente determinado, en este caso usando ciclos de inmersión de 5 minutos cada hora (Fig. 4).

De acuerdo al diagrama, mostrado en la figura 4, el temporizador 1 esta conectado con la bomba y la válvula número 1, mientras que el temporizador 2, está conectado con la bomba y la válvula 2. Todo el sistema, tiene una única

Figura 3. Tapones de caucho, usados para la construcción del biorreactor, el tubo 1, permite el recambio de medio entre los dos frascos; el tubo 2, esta conectado a una válvula solenoide que se abre para permitir la salida moderada de aire y así liberar presión dentro del frasco; el tubo 3, esta conectado a la bomba de aire. La flecha señálale cierre hermético de alambre que asegura las tapas.



a.

b.

Figura 2. a. Sistema prototipo de inmersión temporal construido. A. tapones ajustables de caucho. B. frascos de 5 litros de capacidad en vidrio, donde están contenidos el medio de cultivo líquido (Izquierda) y los explantes (Derecha). C. Bombas de aire. D. temporizadores ó timers. E. válvulas solenoides. La flecha señala los filtros de 0.5µm. b. vista desde arriba para mostrar la distribución de los componentes del biorreactor.

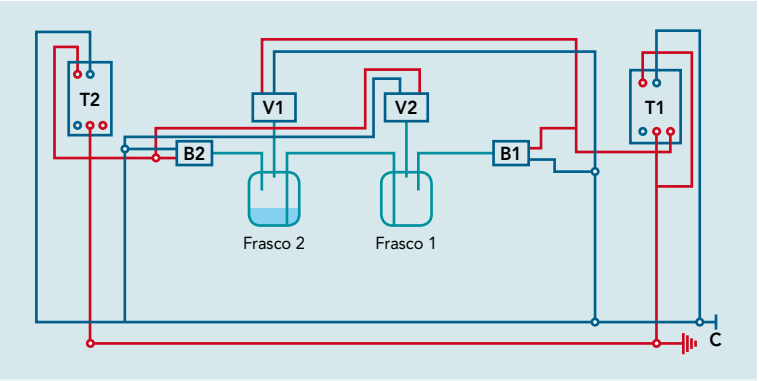


Figura 4. Diagrama electro-neumático del sistema biorreactor de inmersión temporal. C: Conexión a la pared de 110 voltios. T1 y T2: temporizadores o timers. V1 y V2: válvulas solenoides. B1 y B2: bombas de aire.

conexión que alimenta el sistema, esto quiere decir que los temporizadores están todo el tiempo conectados, y programados, en este caso con ciclos de encendido de los elementos 1 cada hora por 5 minutos, y luego para encender los elementos 2 por 5 minutos. Entonces, cuando se activa la programación del temporizador 2, inmediatamente se enciende la bomba 2 y se abre la válvula 2, permitiendo esto la entrada del aire al frasco 2, ejerciendo presión y permitiendo la transferencia del medio líquido al frasco 1; transcurridos 5 minutos, la bomba y la válvula 2 se apagan; y el segundo temporizador se activa, encendiendo la bomba 1 y la válvula 1, devolviendo esto el medio de cultivo al frasco 2. Transcurridos 5 minutos estos se apagan y el ciclo vuelve a activarse 1 hora después.

CONCLUSIONES

Para la inducción de organogénesis directa, resultó ser más eficiente y estable la respuesta mostrada por la variedad Kaly; Así la mayor proporción de explantes con inducción a organogénesis, y el mayor número de brotes organogénicos producidos para esta variedad, se dio bajo la influencia hormonal de TDZ a una concentración de 0.05 mg/l en medio líquido, 30g/l sucrosa, medio MS 4.4g/l y un pH de 5.8.

Como resultado de este trabajo, se logró construir un sistema prototipo de inmersión temporal, con insumos que se pueden conseguir en el mercado nacional, cuyo funcionamiento se da adecuadamente.

La tecnología de los sistemas de inmersión temporal, dentro de biorreactores para el cultivo *in Vitro* de clavel, puede presentarse como una alternativa viable, que permitiría mejorar los coeficientes de multiplicación, desarrollo de brotes y plántulas y calidad fisiológica de variedades de clavel comercial, como lo son los casos estudiados aquí.

La construcción de un sistema prototipo biorreactor de inmersión temporal, en el que se puedan garantizar además de un óptimo funcionamiento y proveer condiciones estériles para el cultivo, resulta ser desde el punto de vista económico y práctico, mucho más viable, ya que comparando este prototipo con el sistema comercial RITA®, el prototipo cuesta 3 veces menos que el sistema comercial y tiene una vida útil mucho mas prolongada, ya que este sistema permite muchos ciclos de esterilización, mientras que el sistema RITA® solo soporta aproximadamente 10 ciclos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Universidad Militar Nueva Granada por el apoyo económico para la realización de este trabajo con el Proyecto CIAS 2005-003.

BIBLIOGRAFIA

1. Aharoni, M. 2002. Aspects of commercial plant tissue culture propagation in liquid media. 1st International Symposium. 'Liquid Systems for *in Vitro* Mass Propagation of Plants'. As. Norway p. 70 – 71.
2. Albarran, J., Bertrand, B., Lartaud, M. and Etienne H. 2005. Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica* L.) somatic embryos. Plant Cell Tissue Organ Culture. 81:p. 27-36.
3. Cassanova, E., Valdez, A.E., Fernandez, B., Moysset, L y Trillas, M.I. 2004. Levels and inmunolocalizacion of endogenous citokininas in thidiazuron induced shoots organogenesis in carnation. Journal Plant Physiology. 161. p. 95-104.
4. Castro, D; Díaz, J y Montoya, N. 2002. Clonal propagation of bananas by biorreactors of temporary inmersion. Memorias XV Reunión: Asociación de Bananeros de Colombia AUGURA. Universidad Católica de Oriente, Unidad de Biotecnología. p. 44-48.
5. Colmenares, M y Giménez, C. 2005. Nuevas estrategias para la inducción de brotes en musáceas. Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad del Zulia (BioVeLuz). p.1-20.
6. Frey, L y Janick, J. 1991. Organogénesis in Carnation. Journal of the American Society for Horticultural Science. 116 (6). P. 1108–1112.
7. Giménez, C y Colmenares, M; 2004. Prototype systems for micropropagation by temporary immersion. Revista Facultad de Agronomía Universidad del Zulia (BioVeLUZ). 21 (1). p. 1-17.
8. Krikorian, A. 1991. Propagación clonal in vitro. En: Roca, W. y Mroginski, L. (Ed). Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. CIAT, Cali. P. 95-125.
9. Onamu, R. Obukosia, S. Musembi, N. and Hutcjinson, M. 2003. Efficacy of Thidiazuron *In Vitro* propagation of carnation shoot tips: Influence of Dose and Duration of Exposure. African Crop Science Journal. 11(2): 125-132 p.
10. Roca, W. M. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) Cali, Colombia. Publicación CIAT No. 151. p. 174-176; 152-160; 340.
11. Rosales, E; Rodriguez, L y Alvarado, O. 2003. Diseño y construcción de un Sistema de Inmersión Temporal. Centro Agrícola, año 30, No. 1. p. 69-72
12. Sankhala, D; Davis, T.D; Sanhkala, N; y Upadhyaya, A. 1995. *in Vitro* Regeneration of the Heat-Tolerant "German Red" Carnation through organogenesis and Somatic Embryogenesis. Gartenbauwissenshaft, 60(5). p. 228-233.
13. Snyman, S.J., Meyer, G.M., Richards, J.R., Ramgareeb, S., Banasiak, M. and Huckett, B. 2007. Use of the temporary immersion RITA® bioreactor for micropropagation of sugarcane. South African Journal of Botany. 73(2). P. 336-337.
14. Ziv, M. 2000. Bioreactor technology for plant micropropagation. Horticultural Reviews. 24. P. 1-30.
15. Ziv, M. 2002. Simple bioreactors for mass propagation of plants. 1st International Symposium. 'Liquid Systems for *in vitro* Mass Propagation of Plants', As, Norway p. 13-14.