



Universidad Autónoma Chapingo

POSGRADO EN INGENIERIA AGRICOLA Y USO INTEGRAL DEL AGUA

**EVALUACIÓN DE UN PROTOTIPO DE INMERSIÓN TEMPORAL PARA LA
MICROPROPAGACIÓN DE LA ORQUIDEA (*Laelia speciosa* K.S.)**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRO EN INGENIERIA AGRICOLA Y USO INTEGRAL DEL AGUA

PRESENTA:

EDINSON MUJICA RODRIGUEZ



**DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES**

Chapingo, Estado de México, Septiembre de 2015.

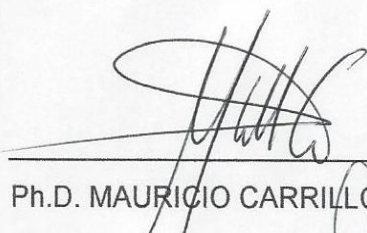


**EVALUACION DE UN PROTOTIPO DE INMERSIÓN TEMPORAL PARA LA
MICROPROPAGACIÓN DE LA ORQUIDEA (*Laelia speciosa* K.S.)**

Tesis realizada por **Edinson Mujica Rodríguez** bajo la dirección del comité asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN INGENIERIA AGRICOLA Y USO INTEGRAL DEL AGUA

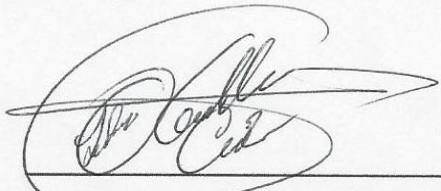
DIRECTOR:


Ph.D. MAURICIO CARRILLO GARCÍA

CO-DIRECTOR:


Dr. JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ DE LA O

ASESOR:


M.C. JOSE GUILLERMO CEBADA REYES

AGRADECIMIENTOS

A: CONACYT,

A la Universidad Autónoma Chapingo,

A la coordinación general de posgrados de la Universidad Autónoma Chapingo,

Al posgrado en Ingeniería Agrícola y Uso Integral del Agua,

A los departamentos de Irrigación, Mecánica Agrícola, Fitotecnia y Agroindustria,

Al Colegio de Posgraduados, Campus Córdoba,

Al comité: Dr. Mauricio Carrillo García, Dr. José Luis Rodríguez de la O, MC. José Guillermo Cebada Reyes, y a los doctores, Claudio Avalos Gutiérrez y Jericó Jabín Bello Bello quienes colaboraron

significativamente en la realización de este trabajo de grado,

A las personas que colaboraron en los laboratorios de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad Autónoma Chapingo y Colegio de Posgraduados, Campus Córdoba, a todos mil gracias por su valiosa colaboración.

DEDICATORIA

A Jehová Dios todo poderoso por la vida y las bendiciones que me ha dado en su bondad inmerecida.

A mis padres Julio E. Mujica Pico y Emma Rodríguez, quienes me han dado todo su amor, ejemplo, valores y apoyo incondicional.

A mis hermanos Juan Felipe Mujica Rodríguez, que quiero y admiro mucho y a mi otro hermano Julio Enrique Mujica Rodríguez Q.E.P.D. quien lamentable no pudo estar en muchos de mis logros pero aún antes de verlos concluidos me demostró toda su confianza y apoyo moral que me dio fuerzas para hoy verlos cumplidos.

A mis sobrinos Holman Stiven, Johan David, Samuel Felipe y José Alejandro.

A mis abuelos Marco Antonio, Bertilda, y Julio Enrique y María Q.E.P.D, a mis tías Gloria, Elsa, Nelcy, Yineth, Ana etc., por ser una gran ayuda como mis segundas madres.

A mis primos Viviana, Angélica, Wilmer y Lorena etc., por compartir momentos importantes en mi formación como persona.

A mis hermanos en la fé en Colombia Yovany, Lecy, Jhon, Heber, Edgar, Carlos, Arsenio y toda la congregación La Rioja en Neiva.

A mis hermanos en la fé en México Claudio, Tere, Hermes, Moisés, Kis, Kir, Sol, Cecy, Jaz, Jarumi, y toda la congregación Chapingo en Texcoco.

DATOS BIOGRAFICOS

Edinson Mujica Rodríguez de nacionalidad Colombiano nació el 23 de noviembre de 1988 en la ciudad de Neiva, Departamento del Huila, inicio sus estudios de primaria en la escuela rural del municipio de Aipe-Huila, finalizando los estudios de secundaria y preparatoria en el año 2003 en el colegio Instituto Técnico Superior de la ciudad de Neiva-Huila. En el año 2004 inicia sus estudios de educación superior ingresando a la Universidad Surcolombiana al programa de Ingeniería Agrícola, obteniendo reconocimientos académicos en el transcurso de su carrera por el promedio académico. En diciembre del 2009 se tituló de Ingeniero Agrícola bajo la modalidad de tesis de investigación en el área de irrigación, específicamente en riego por superficie, eligiendo esta modalidad a la de mejor promedio académico de su generación, a la cual también podía optar. En el año 2011 inicia la especialización en ingeniería ambiental en la Universidad Surcolombiana, mediante una beca que le otorga la mencionada Universidad por su promedio académico durante la carrera, se tituló en el año 2012 mediante la modalidad de tesis de investigación en el área de certificación ambiental de fincas. Se desempeñó desde el 2009 como investigador de la Universidad Surcolombiana y COLCIENCIAS, haciendo parte del grupo de investigación Hidroingeniería y Desarrollo Agropecuario GHIDA, el Centro de Investigación de Recursos Geoagroambientales CENIGAA, EL Centro de Investigación para las pasifloras CEPASS, y como laboratorista en el laboratorio de Suelos de la facultad de Ingeniería así como, para la empresa INGENIERA DE RIEGOS en el área de edafología, análisis físico de suelos. En el mes de agosto del año 2013 ingresó a la Maestría en Ingeniería Agrícola y Uso Integral del Agua en la Universidad Autónoma Chapingo, México. Durante sus estudios de maestría, realizo presentaciones en diferentes congresos nacionales e internacionales de ingeniería agrícola, presentando parte de sus resultados de investigación y de clases, además de una estancia de investigación en el Colegio de Posgraduados campus Córdoba bajo la asesoría del doctor Jericó Jabín Bello Bello.

EVALUACION DE UN PROTOTIPO DE INMERSIÓN TEMPORAL PARA LA MICROPROPAGACIÓN DE LA ORQUIDEA (*Laelia speciosa* K.S.)

EVALUATION OF A PROTOTYPE FOR TEMPORARY IMMERSION MICROPROPAGATION ORCHID (*Laelia speciosa* K.S)

Edinson Mujica Rodríguez¹, Mauricio Carrillo García², José Luis Rodríguez de la O³ y José Guillermo Cebada Reyes⁴

¹Estudiante

²Director

³Co-Director

⁴Asesor

RESUMEN

Los sistemas de inmersión temporal (SIT), son útiles en la obtención y multiplicación de plantas en ambientes controlados, debido a que incrementan el número de plántulas y disminuyen el tiempo de multiplicación, y los costos de producción. Sin embargo, los inconvenientes es que requieren de diferentes equipos y materiales, así como diversos suministros propios para su operación. Por esta razón, se diseñaron dos versiones de un prototipo de inmersión temporal llamado BioEdUACH construido con materiales de bajo costo y de calidad mediana para disminuir los costos y aumentar los beneficios. Las evaluaciones del prototipo se hicieron utilizando brotes de la orquídea *Laelia speciosa* K.S., obtenidos *in vitro* en un medio Murashige y Skoog (MS, 1962) suplementado con 0.5 mg.L⁻¹ de

Bencilaminopurina (BAP). La evaluación experimental incluyó tres sistemas de micropropagación, dos de estos convencionales (semisólido e inmersión parcial) y otro con inmersión temporal por gravedad llamado BIG. El prototipo BioEdUACH se ajustó con tiempos de inmersión de 1 minuto cada 1.5 horas y promovió 8 brotes por explante sembrado en 31 días de multiplicación, siendo superado por el tratamiento semisólido e inmersión parcial con 10 brotes en 71 días de cultivo. No obstante el mejor fue el BIG con 2 minutos de inmersión cada 4 horas, con una frecuencia de inmersión que promovió una tasa de multiplicación de 29 en 71 días. El prototipo de inmersión BioEdUACH, diseñado y construido con materiales de bajo costo, funciono eficientemente de acuerdo al objetivo planeado.

Palabras Clave: BIG, BioEdUACH, *Laelia speciosa*.

ABSTRACT

Temporary immersion systems (TISs) are useful to obtain and reproduce plants in controlled environments, since they increase the number of seedlings and decrease the development time as well as the costs of production. However, TISs require different equipment and materials, as well as various supplies for their operation. For these reasons two versions of a temporary immersion prototype were designed, built with low-cost and medium-quality materials to decrease costs and increase benefits. The designed prototype was named BioEdUACH. The prototype's evaluations were made using sprouts from the *Laelia speciose* K.S. orchid, which were obtained *in vitro* in a Murashige and Skoog medium (MS, 1962), adding 0.5 mg.L⁻¹ of Benzylaminopurine (BAP). The

experimental tests were performed with three micropropagation systems: two of these were conventional (semi-solid and partial immersion), and the other was with temporary immersion by gravity called BIG. The BioEdUACH prototype was used with 1 minute long immersion times every 1.5 hours and resulted in 8 shoots per explant in 31 days of development, which was surpassed by the semi-solid and partial immersion treatment with 10 shoots in 71 days of cultivation. However, the best prototype turned out to be the BIG system with 2 minutes of immersion every 4 hours, with an immersion frequency that promoted a 29 multiplication rate in 71 days. The BioEdUACH immersion prototype, designed and built with low cost materials, worked efficiently in accordance with the planned objective.

Keywords: BIG, BioEdUACH, *Laelia speciosa*.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	iii
DECICATORIA.....	iv
DATOS BIOGRAFICOS.....	v
INDICE DE TABLAS.....	x
INDICE DE FIGURAS.....	x
1. INTRODUCCION.....	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo General	3
2.2. Objetivos Específicos	3
2.3. Hipótesis	3
3. REVISION DE LITERATURA.....	4
3.1. Sistemas de inmersión	4
3.1.1. Efecto de los sistemas de inmersión temporal en la calidad	5
3.1.2. Impacto de los sistemas de inmersión temporal en los costos de producción.....	6
3.2. Tipos de sistemas de inmersión temporal	7
3.2.1. RITA®.....	7
3.2.2. BioMINT™	8
3.2.3. PA-TIS enriquecido con CO ₂	10
3.2.4. Plantform.....	11
3.2.5. Plantima®.....	11
3.2.6. WAVE Biorreactor™.....	12
3.2.7. B.I.B®	13
3.2.8. Modelo mexicano	14
3.2.9. MATIS©.....	15
3.2.10. SETIS™	16
3.2.11. BIT®.....	17
3.2.12. BIG	18
3.3. Luz LED en la micropropagación.....	20

3.3.1.	Ventajas y desventajas de la luz LED	21
3.3.2.	Espectro electromagnético en el desarrollo vegetal.....	22
3.5.	Micropropagación.....	23
3.5.1.	Embriogénesis somática (ES).....	25
3.5.2.	Medio de cultivo	26
3.5.3.	Reguladores de crecimiento vegetal	27
3.5.4.	Las auxinas.....	28
3.5.5.	Las citocininas	28
3.6.	Orquídeas	29
3.6.1.	<i>Laelia speciosa</i> K.S.....	31
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
4.1.	BioEdUACH.....	36
4.2.	Funcionamiento del BioEdUACH	40
4.3.	Establecimiento de los cultivos asépticos en el BioEdUACH	43
4.4.	Establecimiento de los cultivos asépticos en el COLPOS	47
4.5.	Instalación de biorreactores BIG	47
4.6.	Comparación de sistemas de micropropagación	48
4.7.	Determinación de frecuencia del BIG.....	49
4.8.	Comparación del BioEdUACH con los otros tratamientos	49
4.9.	Diseño experimental y análisis estadístico	50
4.10.	Comparación de precios BioEdUACH y BIG.....	50
5.	RESULTADOS Y DISCUSION	52
5.1.	BioEdUACH.....	52
5.2.	Establecimiento de los cultivos asépticos en el BioEdUACH	55
5.3.	Establecimiento de cultivos asépticos en el COLPOS y comparación de los sistemas de micropropagación.....	58
5.4.	Determinación de frecuencia del BIG.....	62
5.5.	Comparación del BioEdUACH con los otros tratamientos	65
5.6.	Comparación de precios BioEdUACH y BIG.....	66
6.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	74
7.	BIBLIOGRAFIA.....	75

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación científica <i>Laelia speciosa</i> K.S.	32
Cuadro 2. Medio Murashige and Skoog (MS, 1962) concentración 10X, 200ml.	43
Cuadro 3. Medio de cultivo líquido.	45
Cuadro 4. Tiempos de funcionamiento de las estaciones del temporizador. ...	54
Cuadro 5. Horas de inicio de los programas del temporizador y de inmersión.	54
Cuadro 6. ANOVA de sistemas de micropropagación.	60
Cuadro 7. ANOVA frecuencia de inmersión.	63
Cuadro 8. Comparación de los cuatro sistemas de microrpropagación.	65
Cuadro 9. Componentes principales del BioEdUACH.	67
Cuadro 10. Parámetros del compresor de aire	68
Cuadro 11. Comparación de precios entre BioEdUACH y BIG.....	69
Cuadro 12. Indicadores de la evaluación económica.	72

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. RITA [®] , A) periodo de exposición, B) dislocación de medio líquido. Aire presurizado es aplicado a compartimiento de medio líquido es desplazado al compartimiento del cultivo por la tubería central, C), periodo de inmersión, D) drenado del medio con nutrientes. Se detiene el flujo de aire presurizado y el medio se regresa al a su compartimiento por gravedad. Fuente: Georgiev <i>et al.</i> , 2014.....	8
Figura 2. Biorreactores basculantes. A y B) principio de biorreactores basculantes, C y D) biorreactor BioMINT. Fuente: Georgiev <i>et al.</i> , 2014.....	9
Figura 3. Izquierda: Biorreactor Plantform. A) interior del contenedor, B) cesta, C) soporte de la cesta, D-F) entrada/salida para el intercambio gaseoso. Derecho: Conexiones de bombas de aire para el biorreactor y unidad de control. Fuente: Welander <i>et al.</i> , 2014.....	11
Figura 4. Esquema Biorreactor Plantima [®] . Fuente: Georgiev <i>et al.</i> , 2014.....	12
Figura 5. Esquema Biorreactor WAVE [™] . Fuente: Georgiev <i>et al.</i> , 2014.	13
Figura 6. Diseño y operación del biorreactor con sistema de burbujas, A) periodo de exposición, B) periodo de inmersión. El aire es suplementado y con el medio en la parte inferior se forman las burbujas, los explantes están expuestos a este ambiente gaseoso. Fuente: Georgiev <i>et al.</i> , 2014.	14
Figura 7. Biorreactor MATIS. A) sala de cultivo <i>in vitro</i> , B) plántulas de café después de 6 semanas, C) ilustración de las piezas del biorreactor. Fuente: Cid-plastiques.....	16

Figura 8. Biorreactor SETIS. Fuente: <i>Duchefa Biochemie B. V.</i> , y <i>Vervit</i>	17
Figura 9. Esquema explicativo de funcionamiento del biorreactor BIT.A) reposo, B) inmersión, C) vaciado. Fuente: <i>Georgiev et al.</i> , 2014.	18
Figura 10. Sistema BIG, A) periodo de exposición, B) dislocación de medio líquido, C) periodo de inmersión, D) drenado del medio. Fuente: <i>Georgiev et al.</i> , 2014.....	19
Figura 11. Esquema general de cultivo de células y tejidos vegetales.	24
Figura 12. Morfogénesis <i>in vitro</i> . Fuente: Curso internacional de biorreactores, 2014.....	26
Figura 13. Concentración de Auxinas y Citocininas y respuestas generadas en el cultivo <i>in vitro</i> . Fuente: Curso internacional de biorreactores, 2014.....	29
Figura 14. a. Esquema del sistema neumático del prototipo BioEdUACH.....	37
Figura 14. b. Esquema del sistema de iluminación del prototipo BioEdUACH.	50
Figura 15. Diagrama de estados del temporizador.	39
Figura 16. Prototipo biorreactor, Vista; a) frontal del Nivel inferior y superior (1m de alto cada uno), b) lateral.	40
Figura 17. Frasco para medio de cultivo en posición; a) vertical, b) vista frontal y c) posterior.	41
Figura 18. a) Frasco para explantes, b) guata (0.5 y 2 cm), esponja (3 cm). ...	42
Figura 19. BioEdUACH, a) abertura de orificios a los frascos con calor, b) lavado y escurrimiento de todos los componentes, c) autoclaveado de los <i>fitting</i> y filtros 0.2 μ m.....	44
Figura 20. Cámara de siembra del Laboratorio de Cultivo de tejidos, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo.	45
Figura 21. Preparación de medios de cultivo.	47
Figura 22. Instalación, a) biorreactores BIG equipados y b) autoclave.	48
Figura 23. Biorreactores instalados en frecuencias de 4, 6 y 8 horas.....	49
Figura 24. Sistema de micropropagación con BioEdUACH.....	50
Figura 25. BioEdUACH, a) primera versión b) segunda versión.....	53
Figura 26. Prototipo de inmersión temporal, a) BioEdUACH b) sistema neumático, c) sistema de iluminación.	53
Figura 27. Control de activación, a) temporizador, b) estaciones y c) relevador.	54
Figura 28. 4 Estaciones del temporizador, a y d) válvula solenoide, b) lámpara germicida para el medio de cultivo c) luz LED roja y azul.	54
Figura 29. BioEdUACH, a) vista lateral, b) conexión del sistema neumático, c) frasco con medio de cultivo.....	55
Figura 30. Frasco con explantes, a) entrada por <i>fitting</i> , b) <i>fitting</i> , c y d) salida del aire por filtro <i>milipor</i>	55
Figura 31. Frascos para medio de cultivo y explantes, a) sin instalar, b) instalados y con explantes.....	56

Figura 32. Explante de BioEdUACH después de 31 días de multiplicación (escala 1cm).	56
Figura 33. Frasco con explantes, a) orificio para <i>fitting</i> sobredimensionado, b) fugas, c) contaminación.	57
Figura 34. Ambiente exterior al BioEdUACH.	57
Figura 35. Micropropagación a) semisólido, b) inmersión parcial, c) BIG.	58
Figura 36. Explantes de <i>Laelia speciosa</i> K.S., después de 31 días de multiplicación <i>in vitro</i> ; a) medio semisólido, b) inmersión parcial, y c) BIG. (Escala 1cm).	59
Figura 37. Explantes después de 71 días fases de multiplicación y primera parte de las fases de elongación y enraizamiento en BIG (escala 1cm).	60
Figura 38. Brotes después de 71 días de multiplicación en BIG (escala 1cm).	61
Figura 39. Explantes de BIG, a) <i>in vitro</i> , b) organogénesis somática directa e indirecta.	62
Figura 40. Brotes después de 25 días de multiplicación en frecuencias; a) cada 4 horas, b) cada 6 horas, c) cada 8 horas (escala 1cm).	63
Figura 41. Explantes de <i>Laelia speciosa</i> K.S., después de 31 días de multiplicación <i>in vitro</i> ; a) Medio semisólido, b) inmersión parcial, c) BIG, y d) BioEdUACH, (escala 1cm).	66
Figura 42. Compresor de aire TOOLCRAFT Modelo TC3555.	67

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Análisis económico del BioEdUACH con <i>Laelia speciosa</i> K.S., proyectado a 5 años.	88
---	----

1. INTRODUCCION

El Cultivo de tejidos vegetales (CTV) es una herramienta biotecnológica, que ha participado en la solución de problemas básicos y aplicados en la biología vegetal como es la micropropagación *in vitro* (Pérez *et al.*, 1999), esta técnica se realiza convencionalmente empleando diferentes medios de cultivo, ya sean de tipo solido o semisólido, para el medio de cultivo semisólido se emplean gelificantes y el medio se distribuye en envases pequeños como tubos de ensayo o frascos *gerber*.

La micropropagación a escala comercial, se ha limitado debido a los altos costos ocasionados por la mano de obra, la baja eficiencia biológica, y la falta de automatización (Bello-Bello, 2014). Una alternativa es el empleo de Sistemas de Inmersión Temporal (SIT), basados en el suministro y contacto intermitente del medio de cultivo con los explantes depositados o sembrados, lo cual promueve y optimiza el desarrollo de los procesos morfogénicos a gran escala, permitiendo reducir los costos de producción y generar un aumento de la productividad del material propagado (Etienne y Berthouly, 2002).

Los SIT han sido empleados para el cultivo de explantes en varias especies de interés hortícola comercial; piña (Escalona *et al.*, 1999, 2003, Espinosa *et al.*, 2002, Pérez *et al.*, 2003, González-Olmedo *et al.*, 2005), fresa (Hanhineva *et al.*, 2005, Hanhineva y Kärenlampi, 2007), caña de azúcar (Lorenzo *et al.*, 1998, Rodríguez *et al.*, 2003, Mordocco *et al.*, 2009, Caamal-Vásquez y Bello-Bello,

2014), vainilla (Ramos-Castellá *et al.*, 2014), chile habanero (Bello-Bello *et al.*, 2010), café (Ducos, *et al.*, 2007, Etienne *et al.*, 2013), plátano (Castro *et al.*, 1999, Colmenares y Giménez, 2003, Roels *et al.*, 2006, Noceda, *et al.*, 2012), papa (Jiménez *et al.*, 1999, Teisson y Alvard, 1999), cacao (Niemenak *et al.*, 2008), entre otros, y de interés ornamental como la Echinacea (Welanders *et al.*, 2014) y en orquídeas de importancia económica y ecológica (Young *et al.*, 2000, Tirado *et al.*, 2005).

Laelia speciosa sp, es una de las especies de orquídea endémica altamente distribuida en las montañas de México. Según el Comité de Conservación de la Asociación Mexicana de Orquideología (2014), esta especie, ha sido de importancia hortícola y cultural, sin embargo, hoy se enfrenta a su supervivencia a largo plazo por la destrucción de los bosques donde crece y, principalmente, la extracción de plantas silvestres para el comercio ilícito. Por ello la legislación mexicana la cataloga como especie sujeta a protección especial (NOM-059-SEMAR-NAT-2010) (Ávila-Díaz *et al.*, 2013) y su extracción y comercio requiere de autorizaciones especiales por parte de las autoridades ambientales, una de ellas puede ser la comercialización de plantas producidas *in vitro*.

El propósito de este trabajo fue diseñar, construir y evaluar un prototipo de inmersión temporal por gravedad para promover el crecimiento de biomasa vegetal de orquídea *Laelia speciosa* K.S., comparado con los sistemas de micropropagación convencional en medio semisólido, inmersión parcial, y con un SIT, de donde se toma la idea para el prototipo, al cual adicionalmente se le determinó la frecuencia de inmersión.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Diseñar, construir y evaluar un prototipo de inmersión temporal por gravedad para promover el crecimiento de biomasa vegetal de orquídea *Laelia speciosa* K.S.

2.2. Objetivos Específicos

- 1.2.1. Diseñar, construir y evaluar un nuevo prototipo de inmersión temporal por gravedad.
- 1.2.2. Establecer cultivos asépticos de orquídea *Laelia speciosa* K.S. en medio semisólido, inmersión parcial y en biorreactores de inmersión temporal por gravedad BIG y el nuevo prototipo.
- 1.2.3. Comparar los sistemas de micropropagación de orquídea *Laelia speciosa* K.S. (semisólido, inmersión parcial y BIG) y determinar la frecuencia de inmersión del BIG.
- 1.2.4. Comparar resultados obtenidos en el nuevo prototipo con los obtenidos en el BIG, en semisólido e inmersión parcial.

2.3. Hipótesis

El sistema de inmersión temporal por gravedad (BIG) presenta mejores resultados de micropropagación que en medios semisólido y líquido con inmersión parcial, y los resultados encontrados en el BIG son similares a los obtenidos en el prototipo de inmersión temporal por gravedad construido en la Universidad Autónoma Chapingo.

3. REVISION DE LITERATURA

3.1. Sistemas de inmersión

Un Sistema de Inmersión Temporal (SIT) convencional consiste en dos recipientes interconectados. Uno se usa para mantener el medio de cultivo y el otro para los explantes (Mulet y de la Cruz, 1999).

Los SIT se clasifican en cuatro grupos según su operación, estos son: de inclinación y balancines, inmersión completa con mecanismo de renovación, inmersión parcial y mecanismo de renovación, inmersión completa con medio neumático y sin reposición de medio. La eficiencia biológica se mide por el número de plántulas obtenidas de cierta especie vegetal.

Para tener SIT eficientes es importante; determinar adecuadamente el tiempo de duración o frecuencia de inmersión, optimizar el volumen del medio de cultivo y el volumen del contenedor, optimizar la aireación y ventilación forzada, y la aclimatación del material obtenido (Etiene y Berthouly, 2002). Una condición de los SIT que favorece la eficiencia, es el desarrollo de un proceso continuo de inmersión, que permite la provisión adecuada de oxígeno y mezcla suficiente del medio de cultivo con los explantes (Teisson *et al.*, 1999).

El método de inmersión temporal brinda la posibilidad de absorción de nutrientes y otras sustancias por las plantas *in vitro*, durante períodos alternos de inmersión en el medio de cultivo líquido y posterior permanencia en el recipiente sin el medio de cultivo (aunque sí con una atmósfera de una elevada

humedad relativa). Este proceso de nutrición alternativa suministra los elementos necesarios al material vegetal e incrementa notablemente la oxigenación del medio interno, lo cual influye positivamente en el crecimiento y multiplicación de las plantas (Cruzat, 2009).

Adicionalmente, con los sistemas de inmersión temporal, se obtiene una reducción de costos de producción, debido a: 1) Reducción considerable en el trabajo, 2) Reducción en el área requerida de trabajo, 3) Reducción en el número de contenedores usados, 4) Mejores condiciones biológicas del material vegetal pasado a campo. (Etienne y Berthouly, 2002).

3.1.1. Efecto de los sistemas de inmersión temporal en la calidad

Según conversación con Escalona en el curso internacional de biorreactores (2014), los sistemas de micropropagación convencional en medio semisólido y frascos herméticos, tienen deficiencias como son: alta humedad relativa y poco intercambio gaseoso, escaso Dióxido de carbono (CO_2), acumulación de etileno, baja luminosidad, desordenes fisiológicos y estructurales que causan baja supervivencia y pérdidas en la aclimatación.

Por el contrario, según Etienne y Berthouly, (2002), las características morfológicas del material vegetal producido en SIT son mejores, en cuanto a elongación de los brotes probablemente por el volumen de los contenedores (Monette, 1983; Krueger *et al.*, 1991), la densidad de plantas obtenidas y el peso fresco como lo comprobaron en Coffee arábica (Etienne-Barry *et al.*, 1999). Algunos autores como Alvard *et al.*, (1993) también comprobaron en

brotos de especies vegetales como *Musa* micropropagados en SIT la ausencia de hiperhidricidad en los brotes y una mejor aclimatación (Aragón *et al.*, 2005).

3.1.2. Impacto de los sistemas de inmersión temporal en los costos de producción

Lorenzo *et al.*, (1998) calcularon que los SIT reducen 46% los costos comparado con el procedimiento estándar en medio semisólido. Escalona *et al.*, (1999) usaron SIT para micropropagar brotes de piña y redujeron los costos de producción en 20% comparado al método convencional, según los anteriores autores, debido a que se reduce el número de contenedores y los niveles de contaminación. Harris y Manson (1983), usando medios de cultivo líquido con máquinas basculantes llevó a costos más bajos por reducción en el volumen de medio a 50% y de agar por 90% o más, además de las ganancias en el rendimiento, tamaño de los brotes y mejor enraizamiento.

Para hacer eficiente una producción a gran escala, tanto por embriogénesis somática como para organogénesis, la configuración del biorreactor y su volumen debe ser determinando de acuerdo a los requerimientos de aireación del material vegetal a propagar (Hvoslef-Eide y Munster, 1998).

Los biorreactores son un rápido y eficiente sistema de propagación clonal, y la automatización de dicho sistema de micropropagación ha sido la respuesta como vía para la reducción de costos (Methrotra *et al.*, 2007), espacio, energía y mano de obra (FAO/IAEA, 2004).

3.2. Tipos de sistemas de inmersión temporal

El RITA (réceptier à immersion temporaire automatique) fue el primer prototipo de inmersión temporal, se desarrolló en Francia, y se ha utilizado con muy buenos resultados hasta ahora en diversas especies vegetales, por ejemplo en vainilla con periodo de contacto de 2 min cada 4 horas (Bello *et al.*, 2010). Todos los nuevos prototipos son modificaciones de este inicial, con cambios en el tipo de recipiente y mecanismo para poner en contacto el medio de cultivo con los explantes (Martre *et al.*, 2001, Gao *et al.*, 2014). También se les conoce como biorreactores de inmersión temporal pero en este trabajo se mencionaran en ocasiones solo como biorreactores.

3.2.1. RITA®

El RITA (CIRAD, France, distribuido por VITROPIC, France), se desarrolló para un cultivo intensivo de plantas *in vitro*. Consiste de un recipiente autoclaveable de policarbonato (1 L) con dos compartimientos separados, separados por una bandeja instalada con un soporte de malla y un tubo de plástico, montado en su centro. Los puertos o entrada y salida de aires están asegurados con filtros de membrana, la entrada de aire está conectada a una línea de aire controlada por temporizador y una válvula solenoide de tres vías (Georgiev *et al.*, 2014).

Los dos compartimientos, uno arriba con las plantas y otro abajo con el medio, al aplicar presión en la parte baja del compartimiento presiona el medio a subir (figura 1), las plantas son inmersas cuando el aire presurizado es aplicado. Durante el periodo de inmersión se burbujea aire a través del medio, agitando suavemente los tejidos y renovando la atmósfera en el interior del recipiente de

cultivo, donde la sobrepresión escapa a través de la salida en la parte superior del aparato (Teisson y Alvard, 1999).

Las ventajas de este sistema según Georgiev *et al.*, (2014) son la simple y segura operación, el compacto espacio por aparato para su acomodación, suministro de suficiente humedad relativa con la separación entre propágulos y medio líquido, la principal desventajas es la inhabilidad para renovar el medio con los nutrientes y la falta de opciones para la ventilación forzada y el enriquecimiento de CO₂.

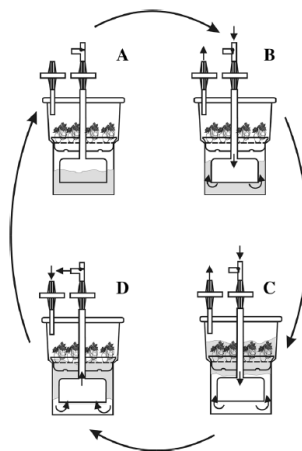


Figura 1. RITA[®], A) periodo de exposición, B) dislocación de medio líquido. Aire presurizado es aplicado a compartimiento de medio líquido es desplazado al compartimiento del cultivo por la tubería central, C), periodo de inmersión, D) drenado del medio con nutrientes. Se detiene el flujo de aire presurizado y el medio se regresa al a su compartimiento por gravedad. Fuente: Georgiev *et al.*, 2014.

3.2.2. BioMINT[™]

Fue patentado con el numero PA/a/2004/003837, Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), Yucatán, México diseñado por Robert *et al.*,

(2006), citado por Bello-Bello *et al.*, (2010). Este sistema de eje de balancín, utiliza una plataforma mecánica para inclinar las cajas de cultivo en un ángulo dado, para que le medio pueda ser pasado de un extremo de la caja a otro. Las cajas de cultivo están hechas de policarbonato transparente autoclaveable, rectangulares, con una abertura de boca ancha lateral, cerrado por un gran tapón roscado con membrana de filtro en el interior. La inclinación de los estantes crea pequeños frentes de onda y alternativamente sumerge y aérea los propágulos cultivados (figura 2). La principal ventaja es que se pueden acomodar grandes números de cajas en un estante y no necesita suministro de aire, las desventajas son necesita más costo e inversión de energía para controlar el sistema electromecánico de la plataforma, requiere más espacio para operar correctamente y esto se refleja en los costos de producción por unidad de espacio, no tiene buena renovación de aire, ni opciones para ventilación forzada o renovación del medio de cultivo (Georgiev *et al.*, 2014).

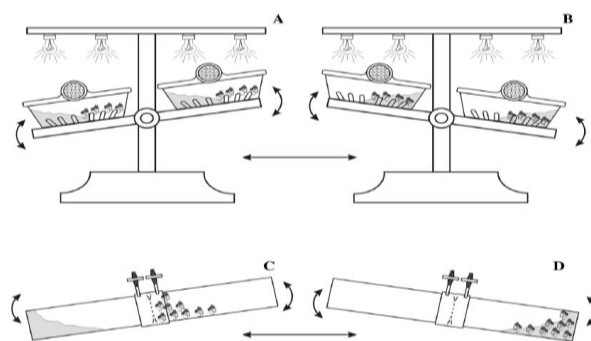


Figura 2. Biorreactores basculantes. A y B) principio de biorreactores basculantes, C y D) biorreactor BioMINT. Fuente: Georgiev *et al.*, 2014.

3.2.3. PA-TIS enriquecido con CO₂

Según Gartenbauwissenschaften, (2010), este biorreactor es un sistema fotoautotrófico de inmersión temporal desarrollado con base en el principio de los frasco gemelos, como un recipiente de crecimiento, fue utilizada la tecnología Nalgene®. Lo componen dos partes de policarbonato. Una tapa y una base, unidos por seis abrazaderas de aluminio.

El frasco se hizo con policarbonato autoclaveable y mangueras de silicona de diámetro 6 mm. El medio es suministrado por una entrada en la frontera inferior de la base, conectado vía tubo de silicona de diámetro 10 mm a una botella con medio y adicionalmente, otra entrada para regresar el medio.

El gas es proveído por un lado opuesto de la entrada y salida en la tapa conectado a una manguera de silicona perforada. La distancia de las perforaciones disminuye a lo largo de la entrada y salida a fin de superar la pérdida de presión y proveer a todas las plantas el dióxido de carbono.

Para la construcción del soporte, mangueras de 4 mm de diametro fueron perforadas en un plato de policarbonato de (31x13 cm). Las plantas pueden ser colocadas y fijadas entre aquellos tubos con el fin de evitar la flotación y de remolino de los brotes, vigas de aluminio estabilizan al portador de los brotes para evitar la flotación durante la inmersión temporal. Las mangueras se conectaron con filtros estériles (0.2 µm, Midisart Sartorius), con el fin de garantizar un cultivo estéril a la entrada y salida de aire y gas.

3.2.4. Plantform

Este biorreactor está hecho de policarbonato transparente con medidas 180x160x150 mm. Tiene una malla con orificios de 1 mm, colocados sobre un controlador para el flujo, las plantas solo están inmersas en el medio de cultivo liquido cuando el aire es aplicado al biorreactor, tiene tres orificios especialmente diseñados para aplicar el medio, aireación y ventilación conectados a mangueras flexibles de plástico recubierto con aluminio y filtros de 0.2 µm de politetrafluoroetileno (PTFE) (figura 3), el biorreactor y los filtros son autoclaveables a 121 °C por 20 minutos. Para más información se puede revisar la página www.plantform.se. (Welander *et al.*, 2014).

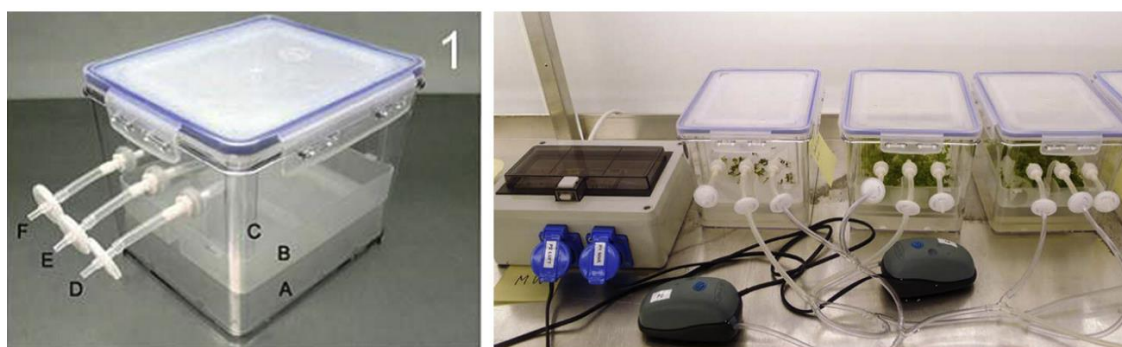


Figura 3. Izquierda: Biorreactor Plantform. A) interior del contenedor, B) cesta, C) soporte de la cesta, D-F) entrada/salida para el intercambio gaseoso. Derecho: Conexiones de bombas de aire para el biorreactor y unidad de control. Fuente: Welander *et al.*, 2014.

3.2.5. Plantima®

Plantima (A-Tech Bioscientific Co., Ltd., Taiwan), es un SIT de pequeño tamaño, neumático y por gravedad, de policarbonato autoclaveable (figura 4), operado con el sistema del RITA y ha sido usado para micropropagación de plántulas, tienen las ventajas de ser apilados uno sobre el otro para ahorrar

espacio, bajos costos de inversión pero como el RITA tiene la desventaja de tener muchos componentes internos, no tiene renovación de medio, no tiene ventilación forzada ni enriquecimiento de CO₂ (Georgiev *et al.*, 2014), (Yang *et al.*, 2011).

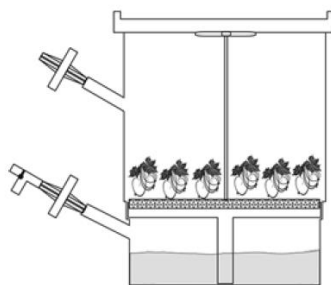


Figura 4. Esquema Biorreactor Plantima®. Fuente: Georgiev *et al.*, 2014.

3.2.6. WAVE Biorreactor™

WAVE Biorreactor™, es un sistema mecánico, de plástico biocompatible, preesterilizado de un solo uso. Sus ventajas son; diseño simple, es una tecnología escalable a nivel comercial, cuando está completamente automatizado tiene sensores de pH y oxígeno disuelto, dióxido de carbono y temperatura, es fácil de manipular, mantiene alta humedad relativa en la cámara de cultivo, y requiere bajos costos de mano de obra (figura 5). Sus desventajas; requiere especializado y costoso control del módulo de balanceo de la plataforma, bajo diámetro de inoculación, no hay suficiente separación entre los explantes y el medio líquido, igual tiempo de inmersión y periodo de exposición, no hay renovación del medio y por ultimo tiene altos costos de inversión (Georgiev *et al.*, 2014).

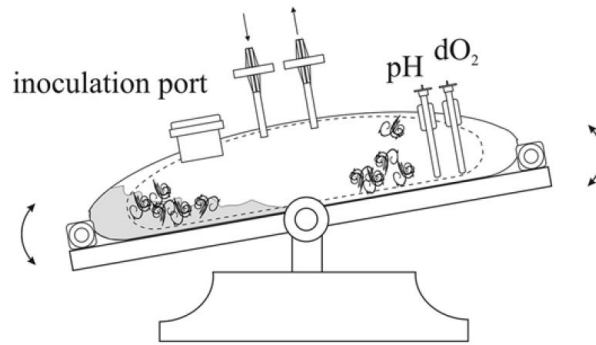


Figura 5. Esquema Biorreactor WAVE™. Fuente: Georgiev *et al.*, 2014.

3.2.7. B.I.B.®

El B.I.B (Bioreactor of Immersion by Bubbles), desarrollado por Soccol *et al.*, (2008) es usado para producir muchas especies de plantas ormanetales y forestales. Fue hecho con vidrio Cylindrical Blindex®, tiene dos compartimientos, dividido transversalmente por una placa porosa de 170 a 220 μm . La parte inferior tiene 3.5 cm de alto con la entrada de aire, la parte superior tiene 24.5 cm de alto y todos estos compartimientos están sobre trípodes de 2 a 5 cm de alto cada uno, con ángulo de 120° . Todos los componentes internos están hechos en acero inoxidable, todo el biorreactor mide 28 cm de alto y 90 mm de diámetro pero puede ser adecuado de acuerdo a las necesidades (figura 6). El equipo trabaja con un sistema interconectado con mangueras flexibles de goma, todos los tejidos vegetales reciben aire y la solución nutritiva por burbujas (Newton-Scheidt *et al.*, 2009).

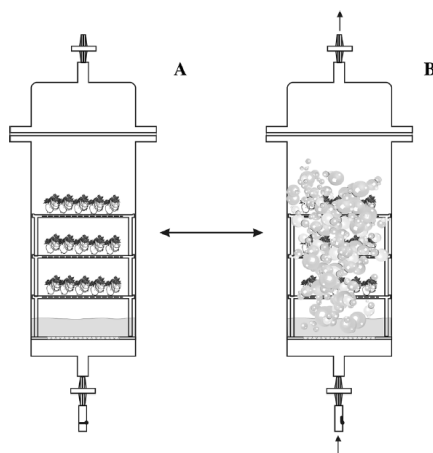


Figura 6. Diseño y operación del biorreactor con sistema de burbujas, A) periodo de exposición, B) periodo de inmersión. El aire es suplementado y con el medio en la parte inferior se forman las burbujas, los explantes están expuestos a este ambiente gaseoso. Fuente: Georgiev *et al.*, 2014.

3.2.8. Modelo mexicano

En México se desarrolló un sistema de inmersión temporal económico en el estado de Nuevo León. Mediante el uso de vasos, válvulas y temporizadores que regulan los ciclos diarios de inmersión, con pocos insumos y a un bajo costo. El sistema es muy sencillo para su fabricación y fue construido en su totalidad con componentes que se pueden comprar en el comercio local, con excepción de los filtros. Consiste en dos recipientes de 250 ml, de vidrio en forma cilíndrica con boca ancha, cada uno lleva un tapón de hule al que se le 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 manguera de plástico, flexible y transparente se conectan los dos recipientes, por los dos tubos que no llegan al fondo de los recipientes e introduce aire por

medio de un compresor, primero en uno y luego en el otro, el medio nutritivo en forma líquida cuando la presión aumenta en el interior del recipiente hace 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 el líquido ha pasado al otro recipiente, se invierte el proceso (Rosales *et al.*, 2003).

3.2.9. MATIS©

El MATIS© es un biorreactor construido de policarbonato transparente, de 290 mm de diámetro y 180 mm de alto, vacío pesa 1.1 Kg (figura 7). Puede contener 3200 ml, el flujo de aire mínimo requerido para la inmersión es 2 a 5 L.min⁻¹, la capacidad óptima de plantas por MATIS es 1000, y se puede autoclavar hasta 50 veces.

Los beneficios del producto son: alta transparencia para un óptimo paso de la luz, diseño horizontal para una mejor propagación de plantas y transmisión de luz, es equipo compacto con mayor volumen de medio de cultivo y fácil uso, resiste altas temperaturas, soporta el autoclaveado, alta resistencia a los impactos y el respaldo de la experiencia de los fabricantes en la industria de biorreactores de inmersión temporal.

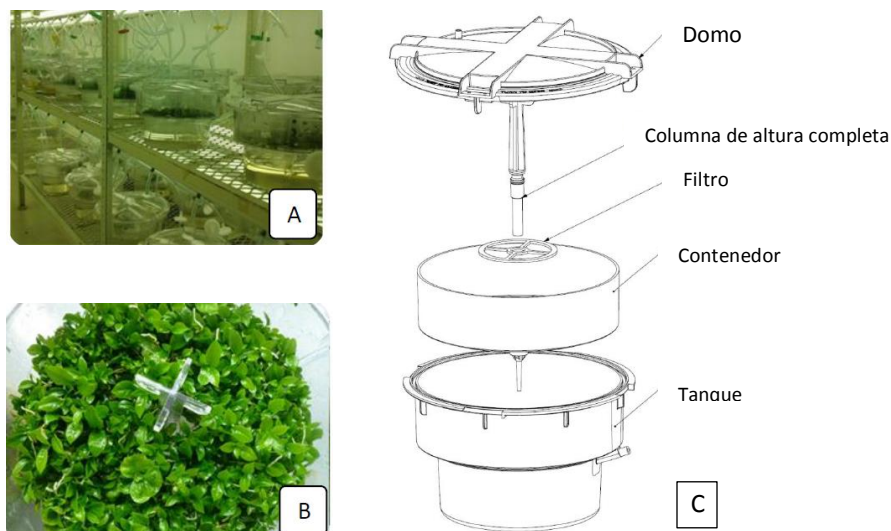


Figura 7. Biorreactor MATIS. A) sala de cultivo *in vitro*, B) plántulas de café después de 6 semanas, C) ilustración de las piezas del biorreactor. Fuente: *Cid-plastiques*.

3.2.10. SETIS™

Compuesto por dos niveles; el primero, nivel de cultivo (5.6 L) con tapa de 8 cm, y el segundo, nivel de medio (4 L) con tapa de 5 cm. El nivel de cultivo está en la parte superior del nivel con el medio, haciendo el sistema muy compacto y fácil de usar. Los niveles contienen dos conectores, las tapas de 8 y 5 cm están cerradas con empaques para un cerrado perfecto.

El nivel de cultivo dispone de 432 cm², con alta capacidad para una óptima distribución del material vegetal. Ensamblado externamente tiene las siguientes medidas 308x180x250 mm, la base mide 240x180 mm.

Requiere una posición horizontal para un óptimo drenaje, la inclinación del nivel con explantes permite el drenaje del medio por gravedad. Un máximo de 3 litros de medio de cultivo es drenado en aproximadamente 5 min, la presión de aire con la que trabaja es de 0.1 - 0.3 bar.

La capacidad del biorreactor depende de la especie vegetal, pero está en un rango de 300 a 1200 plantas por biorreactor. Todos los componentes están localizados en el frente del biorreactor (figura 8), simplificando el acceso una vez colocados en el anaquel, (Ficha técnica SETIS, Duchefa Biochemie B.V).



Figura 8. Biorreactor SETIS. Fuente: *Duchefa Biochemie B. V., y Vervit.*

3.2.11. BIT®

También llamado frascos gemelos, es uno de los primeros biorreactores de inmersión parcial desarrollados, consiste en dos contenedores conectados entre sí por una U de manguera de silicona. Uno de los contenedores hace la función de cámara para el cultivo y la otra como tanque de almacenamiento de medio. El contenedor del cultivo tiene un material de soporte para los explantes. Cada contenedor está conectado a una línea presurizado de aire, controlado por dos temporizadores independientes, conectados a válvulas solenoides de tres vías. Este diseño simple es seguro y favorable para muchos laboratorios.

Una desventaja de este sistema es la automatización completa, pues necesita dos temporizadores y dos válvulas solenoides de tres vías (figura 9), la falta de

conocimiento de la renovación de los nutrientes del medio, ventilación forzada y suplemento de CO₂.

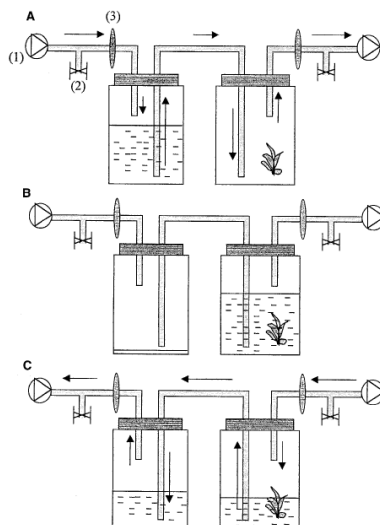


Figura 9. Esquema explicativo de funcionamiento del biorreactor BIT. A) reposo, B) inmersión, C) vaciado. Fuente: Georgiev *et al.*, 2014.

3.2.12. BIG

El biorreactor de inmersión temporal por gravedad (BIG) tiene el mismo principio de los frascos gemelos o Biorreactor de inmersión temporal (BIT) (Escalona *et al.*, 1999). Aún no ha sido patentado debido probablemente a que es el más económico, de fácil construcción y funcionamiento.

Descrito por Georgiev *et al.*, (2014) como biorreactor de flujo y reflujo, es una simplificación de los frascos gemelos, consiste en dos frascos, uno grande que cumple la función de cámara de siembra y otro pequeño como tanque de almacenamiento del medio de cultivo, interconectados por su parte externa. En la cámara de siembra las plantas están sobre esponja de poliuretano que mantiene suficiente humedad (85-90%). La ventaja de este sistema son; simple

construcción, automatización simplificada, y bajo consumo de energía (figura 10). Sus desventajas principales son la distribución no uniforme de la luz que incide en las plantas, la ausencia de ventilación forzada y el enriquecimiento de CO₂.

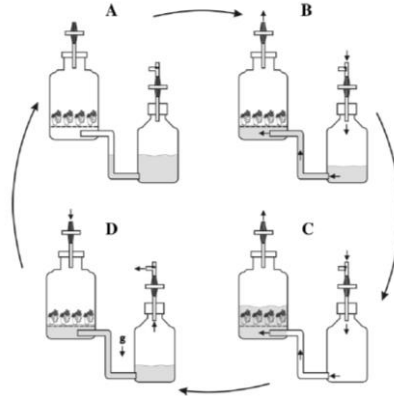


Figura 10. Sistema BIG, A) periodo de exposición, B) dislocación de medio líquido, C) periodo de inmersión, D) drenado del medio. Fuente: Georgiev *et al.*, 2014.

En el colegio de posgraduado Campus Córdoba, se tiene este sistema, que para experimentación en este caso consiste en dos frascos de vidrio de 1L, con tapa de policarbonato y empaque, ubicados en dos diferentes niveles uno encima de otro conectados externamente con manguera de silicona recubierta con aluminio de 10 mm de diámetro, en la parte superior está el frasco de los explantes, en la parte inferior el frasco con medio cultivo. La tapa del frasco con medio tiene dos entradas, una para la entrada de aire presurizado por filtro (0.2 µm) y la otra para el flujo del medio a los brotes durante la inmersión temporal y regreso al frasco al finalizar la inmersión por gravedad, el aire sobre presurizado sale por un filtro en la parte superior del frasco con explantes.

3.3. Luz LED en la micropropagación

Son la más reciente tecnología en ingresar al campo de la agricultura en ambientes controlados (Salgado y Garciglia, 2000). Debido a su elevadísima eficiencia en la transformación de energía eléctrica en lumínica, con una casi nula disipación de radiación en forma de calor, promete tener un gran potencial reduciendo los costos totales de iluminación (Aguirre, 2001).

La tecnología LED (Ligth Emitting Diode) presenta una energía muy eficiente en comparación con otros productos convencionales de iluminación. Los LEDs necesitan menos cantidad de energía para operar y son capaces de producir mayor luz si los comparamos con el resto de la iluminación artificial, ya sean bombillas incandescentes o lámparas fluorescentes.

Tras la exposición a LED, plantas cultivadas in vitro han demostrado mejoras significativas en el crecimiento y la morfogénesis. En particular con luces, rojo y azul, se ha observado que una mezcla de LEDs azules y rojos dan mayor crecimiento a las plantas porque existen conjuntos moleculares diferentes a las clorofilas que utilizan radiaciones distintas, son los fotomodulares o fototransmisores que conforman el fitocromo, amplio conjunto de pigmentos sensores que controlan muy diferentes procesos de desarrollo de las plantas de los cambios operados en su entorno ambiental, optimizando su crecimiento, con un aumento de peso fresco y seco, en comparación con LEDs monocromáticos (Nhut et al, 2000; Duong et al, 2003; Kim et al, 2004; Poudel et al, 2008; Shin et al, 2008, Li et al, 2010).

3.3.1. Ventajas y desventajas de la luz LED

Algunas de las principales ventajas en LEDs son:

- Reducción en el consumo de energía, puesto que, son más eficientes y producen gran cantidad de luz, en comparación con la iluminación incandescente.
- Durabilidad (Girón, 2012, Folta *et al.*, 2005).
- Presenta la misma intensidad de color desde el primer momento de uso hasta el último, lo que no ocurre con las demás tecnologías convencionales, donde existe una degradación con el paso del tiempo.
- Es posible hacer ajuste en la intensidad de color.
- No contienen mercurio.
- Presentan un tamaño compacto.

Los focos incandescentes generan energía luminosa al hacer pasar electricidad por un filamento, generalmente de carbono, dentro de un vacío creado por una bombilla de cristal. Al producir luz por medio de energía calórica, la vida útil de este tipo de focos es relativamente corta en comparación con tecnologías como los focos ahorradores fluorescentes y las lámparas LED.

Por su parte, las lámparas LED funcionan utilizando diodos luminiscentes, los cuales se agrupan para conseguir una mayor intensidad. Debido a sus características y a que no utilizan materiales incandescentes, este tipo de lámparas tienen una vida útil mucho mayor, además de requerir una cantidad muy pequeña de electricidad para operar.

Algunos inconvenientes o desventaja que tiene esta tecnología es la inversión inicial, porque son dispositivos muy costosos. Pero esta inversión puede ser amortizada sin pasar mucho tiempo por la durabilidad (Girón, 2012).

3.3.2. Espectro electromagnético en el desarrollo vegetal

La luz o radiación visible (región del espectro electromagnético comprendido entre los 380 y 760nm) es fundamental para el crecimiento de las plantas. Los vegetales presentan sensibilidad a la radiación muy diferente de la del ojo humano (con máximo de sensibilidad a 555nm), y sus fotosensores en las regiones del espectro electromagnético comprendidas desde el UV hasta los 740nm, controlan varios aspectos de su crecimiento y desarrollo (Giron, 2012).

Analizando el espectro, desde la longitud de onda más corta a la más larga de la luz visible corresponde al color violeta, azul, verde, amarillo, naranja y rojo. El color rojo y azul estimulan y regulan el proceso de crecimiento de la planta, también se promueve la formación de la clorofila en la superficie de las hojas para absorber energía y convertirla en energía química en el proceso de la fotosíntesis. La función principal del color verde consiste en regular el desarrollo vegetativo, el periodo de floración y la apertura de estomas en las hojas (Girón, 2012).

3.4. Cultivo de tejidos vegetales

Se le denomina cultivo de tejidos vegetales (CTV) según Pérez et al., (1999), al conjunto de técnicas que permiten el establecimiento, mantenimiento y

desarrollo de cualquier parte de una planta, desde una célula hasta un organismo completo, bajo condiciones artificiales, asépticas y controladas.

Los principios básicos del CTV fueron definidos a principios del siglo XX por Haberlandt (1902), estos primeros trabajos tuvieron limitaciones debido a tres factores, el primero de ellos era el desconocimiento de los requerimientos nutricionales de los tejidos vegetales cultivados *in vitro*; el segundo, era el uso frecuente de tejidos vegetales maduros y bien diferenciados para iniciar los cultivos, y finalmente el tercer factor que retardo el desarrollo de las técnicas de CTV fue la ignorancia de la existencia de fitohormonas o reguladores de crecimiento (Pérez et al., 1999).

3.5. Micropropagación

Debido a la totipotencia o habilidad que tienen las células vegetales de convertirse en una planta nueva, el balance hormonal, permite la multiplicación masiva, el éxito también consiste en escoger un tejido adecuado de una planta seleccionada y esperar que las plantas hijas sean idénticas o que mantengan las características originales. Considerando la ventaja de que es una producción no estacional (Abdelnour-Esquivel y Vicent, 1994).

Se llama micropropagación a la propagación asexual de plantas utilizando las técnicas de cultivo de tejido *in vitro*. Es una de las aplicaciones de técnicas que componen la llamada biotecnología vegetal, se debe a su enorme productividad al comparársele con las técnicas tradicionales de propagación (figura 11).

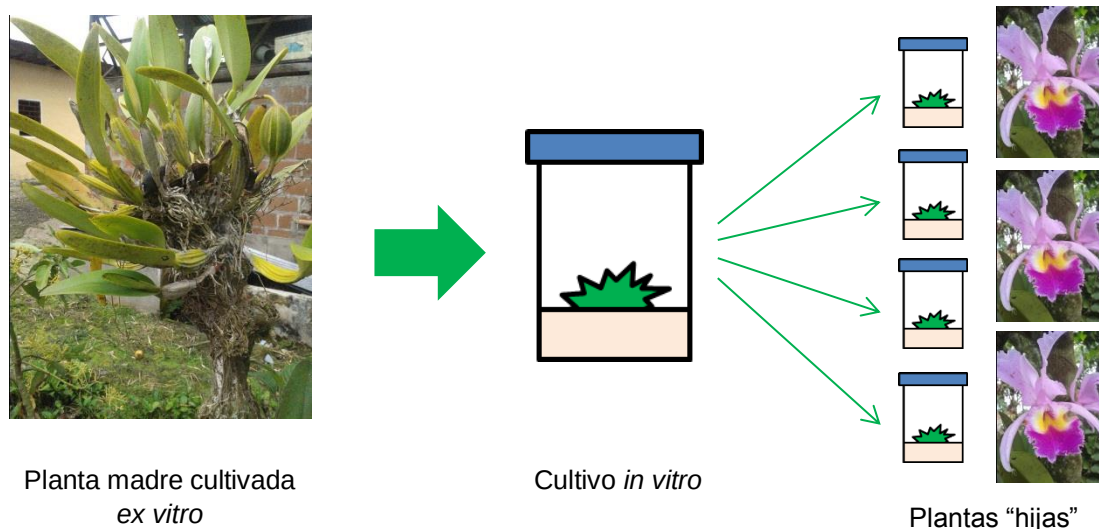


Figura 11. Esquema general de cultivo de células y tejidos vegetales.

El proceso de cultivo *in vitro* empieza con la escisión de una pequeña porción de tejido de la planta, el cual implica la eliminación de microorganismos contaminantes y su plantación en un medio de cultivo. La parte de la planta que se usa para iniciar el proceso se llama explante (De Bartolini y Lallana, 1995), los nuevos brotes o callos que producen este explante por proliferación son divididos en propágulos, que se vuelven a cultivar para su multiplicación, finalmente se desarrollan nuevos tallos y raíces, de manera que se obtienen nuevas plantas (Hartmann y Kester, 2001). El éxito o fracaso del cultivo *in vitro* depende de; elección del explante, elección del medio, condiciones de cultivo y condiciones asépticas.

Una clasificación general de los sistemas de micropropagación y de cultivo de tejidos y células es la siguiente: cultivo de callo (Martre *et al.*, 2001), suspensiones de células y cultivos de protoplastos (Hartmann y Kester, 2001). Donde callo se conoce como el conjunto de células procedentes de la

desorganización de un tejido o una suspensión de células, también puede resultar como respuesta a una herida o corte (De Bartolini y Lallana, 1995), el callo presenta células no diferenciadas que conservan el poder de dividirse. Las suspensiones celulares consisten de células libres y microagregado de células en medio líquido en movimiento, los protoplastos son células sin pared pectocelulósica solamente membrana citoplasmática (Abdelnour-Esquivel y Vicent, 1994).

Las cinco etapas básicas de la micropropagación son: la selección de la planta donadora, el establecimiento o iniciación de los cultivos, la multiplicación de brotes, la fase de crecimiento exponencial por hormonas, el crecimiento y enraizamiento, y finalmente la fase de aclimatación.

Las principales desventajas que tiene la micropropagación son: la inversión inicial en el laboratorio y los requerimientos de personal con un alto nivel de capacitación; en cuanto al costo de producción no es elevado. Pueden obtenerse precios bastante competitivos, sobre todo en la producción de especies de alto valor o de aquellas que son de difícil propagación por métodos tradicionales como los ornamentales, frutales y forestales.

3.5.1. Embriogénesis somática (ES)

La ES se refiere a la formación de un embrión somático, es decir, a partir de células somáticas que no son el producto de la fusión de gametos (De Bartolini y Lallana, 1995). Esta terminología fue utilizada por Tokin en 1963 para describir la formación de un individuo a partir de una o varias células somáticas.

Este fenómeno no debe confundirse con la organogénesis (Abdelnour-Esquivel y Vicent, 1994). Sin embargo, es importante resaltar que la embriogénesis somática puede acompañarse de un fenómeno llamado callogénesis o formación de un callo (figura 12); lo anterior es el resultado de la totipotencia (Abdelnour-Esquivel y Vicent, 1994).

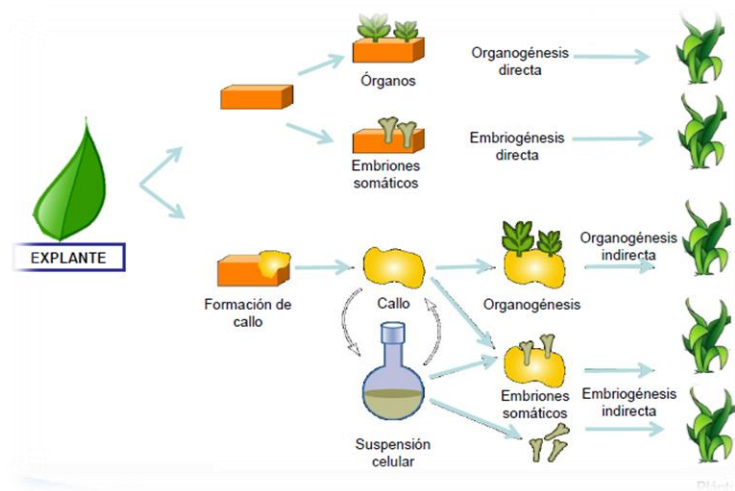


Figura 12. Morfogénesis *in vitro*. Fuente: Curso internacional de biorreactores, 2014.

3.5.2. Medio de cultivo

Los tejidos vegetales cultivados *in vitro*, salvo muy raras excepciones, no son autótrofos, ya que su tasa fotosintética está muy disminuida, razón por la cual requieren de la adición de carbono orgánico, además de sustancias orgánicas que en condiciones normales la planta es capaz de producir como por ejemplo la tiamina (Pérez, *et al.*, 1999).

En la actualidad se han desarrollado una gran cantidad de medios de cultivo, por ejemplo: MS (Murashige y Skoog, 1962), medio B5 (Gamborg, 1968), medio NN (Nitsch y Nitsch, 1969) (Pérez, *et al.*, 1999), que cumplen los requerimientos

nutricionales necesarios de los tejidos cultivados *in vitro*. Todos los medios están compuestos por: macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg y S), micronutrientes (Mn, B, Cu, Mo, Co, I), fuentes de carbono (sacarosa), vitaminas, fuentes de nitrógeno orgánico, complejos orgánicos, reguladores de crecimiento, gelificantes y otros elementos. Actualmente uno de los medios de cultivo más utilizado es el MS (Murashige y Skoog, 1962).

3.5.3. Reguladores de crecimiento vegetal

También conocidos como hormonas vegetales o fitohormonas, los reguladores del crecimiento vegetal (RCV) son compuestos orgánicos sintetizados por la propia planta, que en muy pequeñas cantidades alteran el crecimiento o los patrones de desarrollo de los cultivos vegetales. Se clasifican en cinco grupos básicos dependiendo de su estructura química y su efecto fisiológico: auxinas, citoquininas o citocininas, giberilinas, ácido abscísico y etileno.

El uso de los RCV en CTV, mediante el manejo de tipos, concentraciones y combinaciones de estos compuestos en un medio de cultivo, se pueden manipular hasta cierto grado los patrones de desarrollo de los tejidos y obtener las respuestas deseadas como son: la formación de tejidos callosos, brotes, embriones somáticos y raíces.

Las sustancias hormonales críticas en el cultivo de tejidos son las auxinas y las citocininas. Estas intervienen en la elongación y división celular, formación de brotes y raíces y en la germinación de semillas (Abdelnour-Esquivel y Vicent, 1994).

3.5.4. Las auxinas

Las auxinas son un grupo de compuestos derivados comúnmente de triptófano, sintetizadas por lo general en los ápices, y que intervienen en el crecimiento y diferenciación celular (Pérez, *et al.*, 1999).

De acuerdo con Evans *et al.*, (1981), citado por Abdelnour-Esquivel y Vicent (1994), en la mayoría de embriogénesis somática, la inducción requiere una concentración alta de auxinas o equivalente: AIA (Ácido indolacético); ANA (Ácido naftalenacético); 2,4-D; 2,4,5-T; picloram (4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid); dicamba.

3.5.5. Las citocininas

Las citocininas son generalmente derivadas de la adenina y son sintetizadas en tejidos jóvenes y raíces. Poseen propiedades que las hacen muy útiles para el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, estimulan la división celular y rompen la latencia de las yemas axilares haciéndolas brotar (Pérez, *et al.*, 1999).

Las citocininas Benciladenina (BA), Bencilaminopurina (BAP), la kinetina y la zeatina son a veces utilizadas en el medio de inducción de la embriogénesis somática. Sin embargo, son ellas mucho más utilizadas en la fase de diferenciación y maduración del embrión somático (Abdelnour-Esquivel y Vicent, 1994).

Según Pérez, *et al.*, (1999), junto con las auxinas, las citocininas regulan la división celular. Debido a lo anterior el balance entre estas dos hormonas de

crecimiento es determinante para el patrón de desarrollo que siga el tejido, la respuesta esperada del tejido ante el balance auxinas/citocininas se muestra en la figura 13, no obstante, pueden presentarse variaciones notables entre especies y tejidos.



Figura 13. Concentración de Auxinas y Citocininas y respuestas generadas en el cultivo *in vitro*. Fuente: Curso internacional de biorreactores, 2014.

3.6. Orquídeas

La palabra orquídea (del latín *orchis*) apareció por vez primera menciona en un manuscrito del filósofo griego *Theophrastus* (371-285 a.C). El nombre significa testículo y hace alusión a los pseudobulbos de algunas especies y al uso medicinal que se le asignaba a esta flor como afrodisiaca y potencializadora de la fertilidad. Con el tiempo, la palabra *orchis* derivó en *Orchidaceae*, término con el que se designó a las familias más numerosas del reino vegetal con próximamente 25000 a 35000 especies. Su diversidad se ve ampliada dado que, por ser un grupo muy joven en la evolución de las plantas, presentan gran facilidad para dar híbridos exitosos no solamente entre especies del mismo

género, sino también intergenéricos (se estima que hay aproximadamente 30.000 híbridos registrados) (Freuler, 2007).

La familia Orchidaceae se divide en dos grupos, dependiendo del tipo de crecimiento básico que presenten: simpodial y monopodial. Las orquídeas simpodiales, como los géneros *Cattleya*, *Dendrobium*, *Cymbidium*, *Miltonia*, *Ocidium*, *Lycaste* y *Paphiopedillum*, se caracterizan por tener retoños individuales de crecimiento finito. De los tallos rastreros llamados rizomas, brotan retoños que se desarrollan en otros tallos y hojas, y que al madurar producen flores. Los tallos de muchas orquídeas simpodiales, se convierten a menudo en órganos de almacenamiento llamados pseudobulbos, que varían mucho de tamaño y forma. Las orquídeas monopodiales, en cambio, tienen un tallo central cuyo extremo crece continuamente, produciendo hojas alternadas e inflorescencias entre las hojas. Otro aspecto variable de las orquídeas es el de la fragancia de las flores. Los olores son mezclas complejas de sustancias químicas que se pueden producir en diferentes partes aromáticas en distintas horas del día o la noche. Apparently esto ocurre para atraer un mayor número y espectro de polinizadores (Murguía, 2007).

La familia *orchidaceae* constituye uno de los grupos de plantas más diversos, con alrededor de 25 mil especies a nivel mundial (Chase *et al.*, 2003; Dressler, 2005). Las orquídeas se distribuyen en todos los continentes (excepto la Antártida) pero su mayor diversidad se concentra, en las regiones tropicales. México, situado en el límite norte del trópico americano, alberga una notable

cantidad de orquídeas y han sido registrados en el país alrededor de 1260 y 170 géneros (Hágsater *et al.*, 2005).

Muchas de las especies de orquídeas están gravemente amenazadas debido a la indiscriminada deforestación, los incendios forestales y los saqueos de dichas especies para fines comerciales; esto ha provocado que numerosas especies de orquídeas estén desapareciendo de los bosques naturales (Tiza, 2010). Actualmente se realizan estudios que permitan la propagación masiva de estas orquídeas ya sea para la liberación de nuevos híbridos comerciales o para la recuperación de las poblaciones naturales (Bayman, 2011).

Las orquídeas están distribuidas desde el nivel del mar hasta grandes altitudes. Son de hábito epífita, por lo cual sus raíces largas y suculentas están adaptadas para vivir expuestas al aire o inmersas en materia orgánica gracias a que poseen un tejido acumulador de agua denominado velo.

3.6.1. *Laelia speciosa* K.S.

Laelia: nombre genérico que ha sido nombrado por "Laelia", una de las vírgenes vestales, o por el nombre romano de "Laelius", perteneciente a una antigua familia romana.

speciosa: epíteto latino que significa "llamativa"

Nombre común: Flor de mayo ó Flor de Corpus.

Laelia speciosa K.S., fue descrita por (Kunth) Schltr. y publicado en *Die Orchideen* 233. 1914 (cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación científica *Laelia speciosa* K.S.

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Liliopsida
Orden:	Asparagales
Familia:	Orchidaceae
Subfamilia:	Epidendroideae
Tribu:	Epidendreae
Subtribu:	Laeliinae
Alianza:	Cattleya
Género:	Laelia
Especie:	L.speciosa

Laelia speciosa es una de las orquídeas americanas más bellas y la orquídea de mayor importancia cultural en México. Aunque otras orquídeas mexicanas, como *Laelia anceps subsp. dawsonii*, son más importantes en la horticultura mundial, la "flor de Corpus" es, al menos en el centro de México, la orquídea por antonomasia.

Junto con unas cuantas especies de orquídeas más, *L. speciosa* apareció ilustrada y descrita en el "Rerum Medicarum Novae Hispaniae Thesaurus" de Francisco Hernández, durante la primera mitad del siglo XVI, por lo que fue una de las orquídeas americanas primero conocidas en Europa, mucho antes de la aparición del sistema linneano de clasificación (Halbinger y Soto, 1997, citado por Soto y Solano, 2007).

3.6.1.1. Hábitat

La flor de corpus se establece entre los 1250 y los 2500m de altitud, en los estados de Zacatecas, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Estado de México, Morelos, Puebla, Querétaro, Tlaxcala, e Hidalgo. Las localidades situadas a menor altitud corresponden a sitios en Tamaulipas y San Luis Potosí, en el límite norte de su distribución del lado del Golfo de México. Su hábitat no es de ninguna manera continuo, sino que se presentan poblaciones aisladas, distantes unas de otras. Se desconoce cuál es el factor determinante para esta distribución en parches. Sin embargo, muchos sitios donde se encuentran poblaciones comparten la presencia del bosque achaparrado de *Quercus desertícola*, la abundancia sobre las ramas de líquenes de *Parmelia*, y la cercanía de lagos extensos. En el Este de México *Laelia speciosa* está en bosques achaparrados y secos con humedad atmosférica alta.

Es muy raro encontrar especímenes litofíticos. Las plantas epífitas tienen una gran preferencia por establecerse sobre *Quercus desertícola*. Dentro de esta especie de encino, las orquídeas se encuentran en ramas gruesas y delgadas, pero no en las ramillas, ni en las ramas de la parte más externa de las copas; tampoco están sobre los troncos y fustes. Una gran proporción de las plantas crece sobre capas de líquenes crustáceos del género *Parmelia* (Hernández, 1992; Soto, 1994, citado por Soto y Solano, 2007).

3.6.1.2. Reproducción

Laelia speciosa es una orquídea que no se autopoliniza pero es autocompatible. Los datos disponibles indican que esta especie no ofrece recompensa a sus

polinizadores y se supone que debe operar un mecanismo de polinización por engaño.

Al igual que muchas otras orquídeas epífitas, esta especie tiene un período de crecimiento activo durante la temporada lluviosa de junio a octubre. La floración se presenta principalmente en mayo y junio (abril-julio), con el racimo emergiendo del nuevo brote en desarrollo. Las cápsulas tardan en madurar aproximadamente un año y las semillas se dispersan durante la temporada de secas, en marzo y abril (Hernández, 1992; Soto, 1994).

3.6.1.3. Conservación

Laelia speciosa es una orquídea en donde se evidencia la necesidad de una estrategia de conservación *in situ* reforzada con una estrategia de conservación *ex situ* que puede generar algunos recursos económicos.

Se ha sugerido que para que cualquier programa de manejo y/o conservación pueda ser exitoso, se debe eliminar la extracción de plantas directamente de la naturaleza, por el daño que hacen a las poblaciones y porque mientras exista, nadie podría competir con los precios ridículamente bajos a los que se ofrecen las plantas en las ciudades (1 a 10 pesos por segmento florido).

Existen numerosos clones en cultivo con características hortícolas sobresalientes, muy superiores al promedio de las plantas silvestres, que deben ser seriamente considerados en cualquier programa de propagación (Soto, 1994). Varios de estos clones han sido premiados por la Asociación Mexicana de Orquideología, A.C. Uno de los problemas que debe contemplar cualquier

programa de propagación a partir de semillas es la gran lentitud en el crecimiento de las plantas, que necesitan unos 10 años para florecer en cultivo adecuado (Halbinger y Soto, 1997 citado por Soto y Solano, 2007).

3.6.1.4. Importancia económica

La importancia de estas plantas radica en su potencial económico dentro de las plantas ornamentales. Se trata de las especies más selectas, y tienen relevancia entre las plantas con flores por su valor en la producción de flor de corte, alcanzando un precio muy alto en el mercado internacional, su cultivo y colección tiene gran importancia económica en el mundo (Winkelmann *et al.*, 2006).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. BioEdUACH

Se diseñó y construyó un Prototipo de Sistema de Inmersión Temporal llamado BioEdUACH, este es semiautomatizado debido a que algunas labores mecánicas que se pueden hacer manualmente se hacen mediante actuadores y un controlador con el accionamiento de una persona. Se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Fitotecnia en la Universidad Autónoma Chapingo. El prototipo está basado en el funcionamiento del sistema de inmersión por gravedad **BIG**, con materiales disponibles en el mercado de bajo costo.

El proyecto del BioEdUACH está constituido por el biorreactor y la estructura metálica con todo su equipo auxiliar:

Biorreactor

El biorreactor está conformado por; dos frascos plásticos de 500 ml, de 13 cm de alto y 7.5 cm de diámetro (uno para el medio de cultivo y otro para los explantes), cada frasco tiene dos *fitting* de doble *oring* de 3/8" y un filtro *milipor* de 2 µm, dos tramos de manguera de 10 mm de diámetro y 12 cm de largo para el frasco con medio de cultivo, guata de 2 cm de espesor como soporte para los explantes y 25 cm de manguera de 1/4" que conecta los dos frascos.

Estructura auxiliar

La estructura auxiliar se construyó también con materiales económicos disponibles en el mercado, tiene una estructura metálica de dos niveles acondicionado con un sistema neumático y otro de iluminación con luces fluorescentes y luces LED, tecnología en iluminación utilizada en la agricultura actualmente, conectándose a corriente alterna con intensidad de 120 V.

El sistema neumático se equipó con un compresor, filtros de aire, regulador de presión, válvula solenoide y mangueras de 6 y 10 mm. En las figuras 14a y 14b se muestra los esquemas de diseño del BioEdUACH.

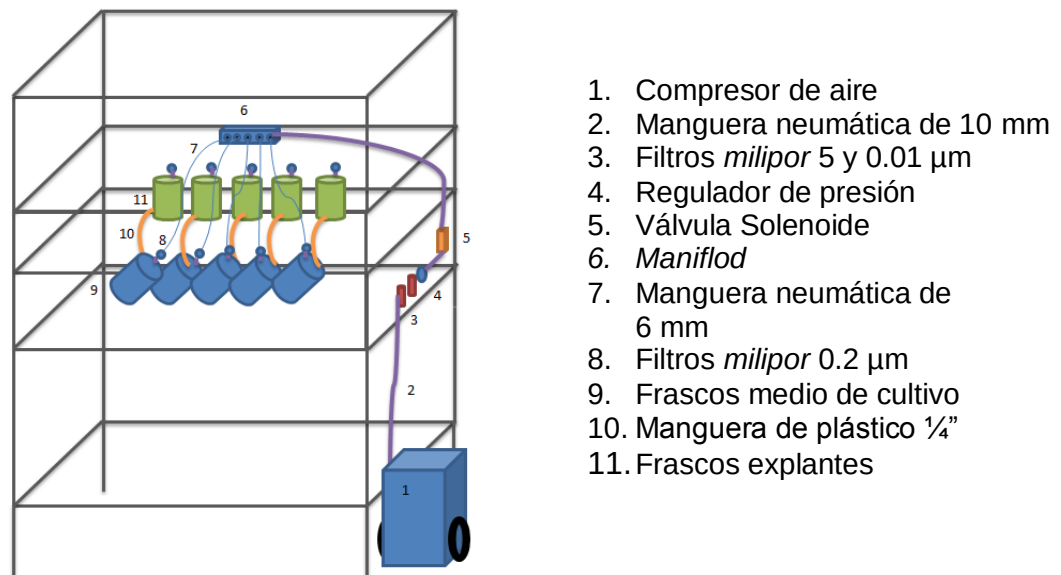


Figura 14. a. Esquema del sistema neumático del prototipo BioEdUACH.

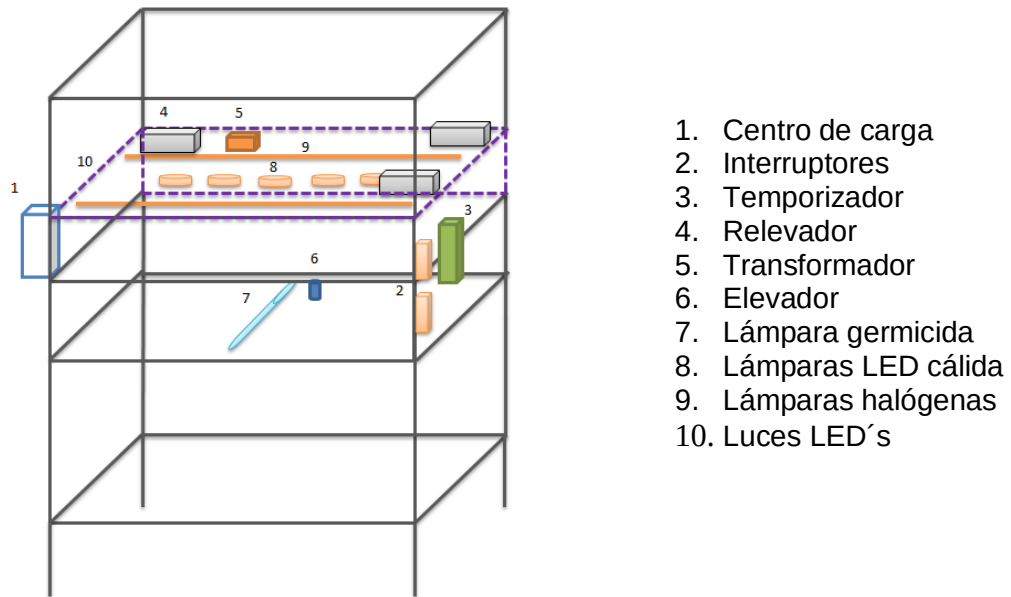
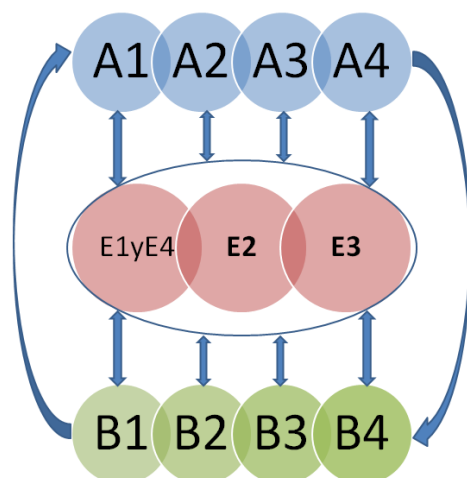


Figura 14. b. Esquema del sistema de iluminación del prototipo BioEdUACH.

El temporizador activa cuatro estaciones en los tiempos de inicio programados (programas A y B), comienza en secuencia la activación, de la estación 1 a la 4, cuando una estación se apaga se enciende la siguiente y termina hasta que la última se apaga. Cada estación puede tener dos horas de inicio, una por cada programa, para un total de 8 horas de inicio del proceso de activación o ciclos, que inician en orden según la hora de inicio y siempre desde la estación 1, como se puede observar en el siguiente diagrama de tiempos o estados (figura 15). Este diagrama es una manera de caracterizar un cambio en el sistema, donde los objetos que lo componen cambian su estado como respuesta a un suceso o al tiempo.



Programa A: A1, A2, A3 y A4.

Programa B: B1, B2, B3 y B4.

Estaciones: E1, E2, E3, E4.

E1 y E4 – Electroválvula,
E2 – Lámpara Germicida,
E3 – Luces LED.

Figura 15. Diagrama de estados del temporizador.

En el Biorreactor la sección superior donde están los frascos con los explantes (0.4 m de altura), se instaló luces LED's que es la última tecnología en iluminación para la agricultura con siete colores posibles (rojo, verde, azul, cian, morado, amarillo y blanco), así como sus combinaciones. Para aumentar la intensidad lumínica se decidió cubrir tres de los costados con cartulina blanca.

La sección donde se ubican los frascos con el medio de cultivo (0.2 m de altura) se cubrió con cartulina color negro debido a que de esta forma la luz no afecte los componentes químicos del medio de cultivo, y para no utilizar vidrio color ámbar como se utiliza en algunos laboratorios para preservar soluciones químicas.

La relación entre los distintos tipos de longitudes de onda utilizadas en el experimento de Navarro (2013), indica que, con una correcta proporción de luces LED de color rojo y el azul, los requerimientos de las plantas son

satisfechos. Por esto, para el BioEdUACH, se utilizó fotoperiodos de luz LED de colores, de una hora cada 4 horas, con proporción 50-50% de luz roja-azul.

En una primera versión del prototipo se utilizaron materiales adicionales que se muestran en la figura 16, que fueron modificados para la versión donde se tomaron las lecturas de micropropagación.



Figura 16. Prototipo biorreactor, Vista; a) frontal del Nivel inferior y superior (1m de alto cada uno), b) lateral.

4.2. Funcionamiento del BioEdUACH

Para las pruebas con explantes de orquídea (*Laelia speciosa* K.S.) en el BioEdUACH se programó el tiempo de inmersión y fotoperiodos en unidades de minutos controlado desde un temporizador con dos instrucciones (A y B), para

cuatro estaciones que tiene disponibles, con tiempos de activación 1 hasta 240 minutos (4 horas).

En la operación del prototipo, el aire sale del compresor, pasa por filtros de 5 y $0.01\ \mu\text{m}$, un regulador de presión con manómetro, una electroválvula solenoide y llega al *manifold* donde se distribuye a los biorreactores.

El aire antes entrar a los frascos que contienen el medio de cultivo pasa por un filtro *milipor* de $0.2\ \mu\text{m}$ para evitar que se contamine el medio y la microatmósfera de los frascos. El nivel inferior, donde se encuentran estos frascos, se irradia con una lámpara germicida, limitando el desarrollo de algas en el medio de cultivo o cualquier otra fuente de contaminación externa.

Es importante que los frascos con medio de cultivo se mantengan en posición horizontal (acostados) sin que el fondo quede levantado, para que todo el medio de cultivo pase a los explantes y no se ahogue el filtro *milipor* de la entrada de aire (figura 17).

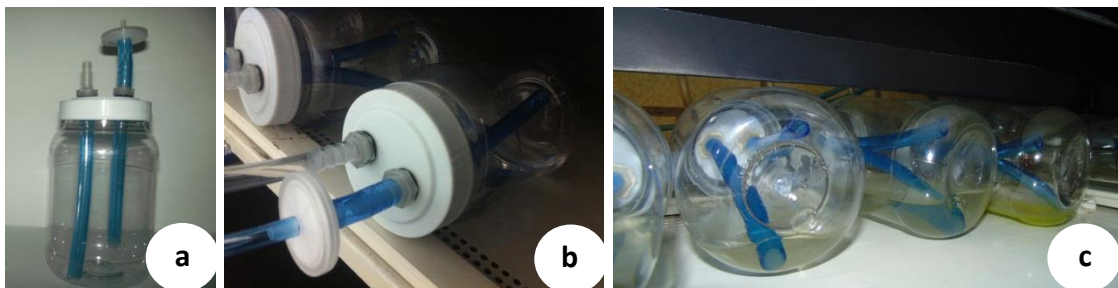


Figura 17. Frasco para medio de cultivo en posición; a) vertical, b) vista frontal y c) posterior.

El aire ingresa a presión al interior de los frascos mediante una manguera colocada desde la tapa hasta el fondo, y sale por otra manguera conduciendo el medio de cultivo líquido la cual se conecta a una manguera exterior que lo lleva a los frascos con explantes.

Los frascos que contienen los explantes se deberán colocar verticalmente (figura 18), quienes son los que reciben el medio de cultivo para los tejidos vegetales de la manguera proveniente de los frascos con el medio, en los frascos de explantes se colocó una guata o material absorbente similar a la esponja de poliuretano como soporte alternativo para los explantes.

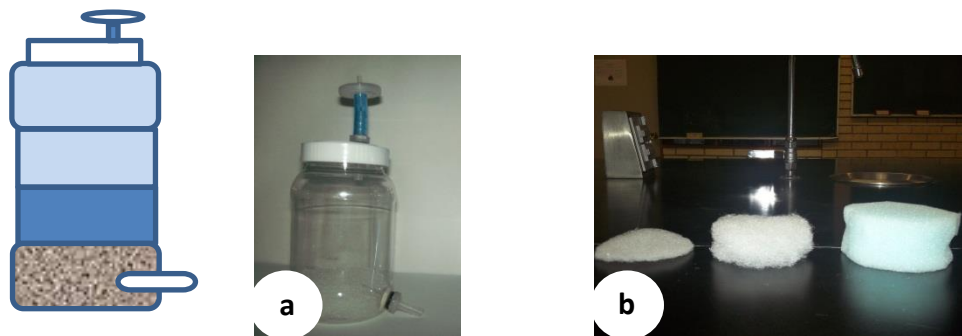


Figura 18. a) Frasco para explantes, b) guata (0.5 y 2 cm), esponja (3 cm).

Después que ingresa todo el medio de cultivo a los explantes y estos están completamente inmersos, ingresa solo el aire quien genera un burbujeo que los agita suavemente. El aire sobre presurizado sale del sistema por un filtro *milipor* de 0.2 μm que funciona como válvula de alivio de presión ubicado en la tapa del frasco con explantes.

4.3. Establecimiento de los cultivos asépticos en el BioEdUACH

Se siguió la metodología propuesta por Ramos-Castellá *et al.*, (2014), en vainilla con la hormona reguladora de crecimiento BAP (Bencil amino purina) y medio MS.

Cuadro 2. Medio Murashige and Skoog (MS, 1962) concentración 10X, 200ml.

SOLUCION A	
KNO ₃	38.0 g
NH ₄ NO ₃	33.0 g
SOLUCION B	
MgSO ₄ ó MgSO ₄ .7H ₂ O	3.6 g ó 7.4 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0.338 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.172 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0005 g
SOLUCION C	
CoCL ₂ 6H ₂ O ó CoCL ₂ .2H ₂ O	Un grano
KI	0.0166 g
CaCL ₂ ó CaCL ₂ .2H ₂ O	6.64 ó 8.80 g
SOLUCION D	
KH ₂ PO ₄	3.4 g
H ₃ BO ₃	0.124 g
Na ₂ Mo ₄ .2H ₂ O	0.05 g
SOLUCION E	
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.54 g
Na ₂ EDTA ó Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0.74g ó 0.82 g
SOLUCION F	
Glicina	0.04 g
Mio-inositol	2.0 g
Ácido nicotínico	0.010 g
Piridoxina HCL	0.010 g
Tiamina HCL	0.002 g

Fuente: (Caamal y Bello, 2014).

Se emplearon brotes obtenidos *in vitro* de flor de mayo (*Laelia Speciosa*, sp.), de 0.5 cm de altura (Bello-Bello *et al.*, 2015) del Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad Autónoma Chapingo, que inicialmente se establecieron como semillas, y se han subcultivado en medio de multiplicación con MS (Murashige y Skoog, 1962).

Para el establecimiento aséptico de los cultivos primero se deben seguir los reglamentos convencionales de laboratorio. Los frascos se deben lavar con detergente y ocupando una esponja para fregar, retirar el detergente con abundante agua a presión, luego se sumergen en solución de hipoclorito de sodio al 0.05%, se escurren, y se introducen a bolsas de plástico hasta la siembra. Para autoclavar los filtros *milipor* se cubre en sus dos extremos con papel aluminio, teniendo precaución que la parte más brillante del papel este hacia el interior y se autoclavean junto con el medio de cultivo y las pinzas o material metálico como porta cúter (figura 19).



Figura 19. BioEdUACH, a) apertura de orificios a los frascos con calor, b) lavado y escurrimiento de todos los componentes, c) autoclaveado de los *fitting* y filtros 0.2 μ m.

Se debe sembrar previo a la siembra en los biorreactores de inmersión temporal en inmersión parcial por mínimo 48 horas en frascos gerber con 5ml de medio

de cultivo líquido (Cuadro 3), esto, para seleccionar los mejores explantes que se van a pasar al biorreactor, teniendo en cuenta principalmente que estén libres de contaminación y vigorosos.

Cuadro 3. Medio de cultivo líquido.

Reactivo	Concentración
MS	10 ml.L ⁻¹
BAP (Bencil Amino Purina)	0.5 mg.L ⁻¹
Sacarosa	30 g.L ⁻¹
pH	5.7±0.1

*Sales Murashige Skoog (MS), soluciones Colpos, Campus Córdoba (Caamal y Bello, 2014).

Todo el proceso de siembra se realiza en campana de flujo laminar (figura 20), con mecheros de alcohol, se debe tener abierto muy poco tiempo los frascos solamente para introducir rápidamente el medio de cultivo y los explantes. Se ponen en los extremos de manguera de 10mm por el extremo más grueso de los filtros de 0.2 µm y se deja el extremo de tamaño jeringa libre para acoplar al prototipo los biorreactores ya instalados.



Figura 20. Cámara de siembra del Laboratorio de Cultivo de tejidos, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo.

Según Abdelnour-Esquivel y Vicent, (1994), el medio de cultivo para la micropropagación de vainilla se agrega 30 g.L⁻¹, las sales minerales y vitaminas MS, se ajusta el pH a 5.8, se adiciona 7 g.L⁻¹ de agar.

Se establecieron 5 BioEdUACH con 20 explantes por frasco y 12.5 ml de medio de cultivo líquido por explante, se utilizó periodos de inmersión de 1 minuto cada 1.5 horas (figura 29). En otros trabajos Se han probado periodos de inmersión de hasta 20 minutos cada 2 horas en banano (*Musa acuminata*), (Alvard *et al.*, 1992). En anturio inmersiones de 3 minutos cada 3 horas (Lara *et al.*, 2004), 1 minuto cada 12, 6 y 4 horas para Pérez *et al.*, (2013), en alcornoque.

Otros autores han utilizado inmersiones de 15 minutos cada hora en orquídea joya (*Anaectochilus formosanus*) utilizando el sistema de inmersión temporal por gravedad BIG, (Wu *et al.*, 2007). Zhu *et al.*, (2005) utilizaron periodos de inmersión de 3-5 minutos cada 1.5 horas con RITA[®] en rizomas de manzana.

Con base en los convenios entre instituciones COLPOS y la Universidad Autónoma Chapingo se hicieron pruebas de los sistemas de micropropagación en medio semisólido, inmersión parcial y SIT en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Campus Córdoba. Con la participación del doctor Jericó Jabín Bello Bello encargado del laboratorio y experto en SIT en México.

4.4. Establecimiento de los cultivos asépticos en el COLPOS

Se establecieron en el laboratorio de cultivo de tejidos del Colegio de Posgraduados, Campus Córdoba, en frascos *gerber* con medio semisólido (20ml) e inmersión parcial (5ml), 3-5 y 10 explantes por frasco respectivamente, suplementados con BAP (Bencil Amino Purina, Sigma ®) (Sanka-Thomas et al., 2008) (cuadro 3). Cinco frascos *gerber* en medio semisólido con *phytagel* (2.5 g.L⁻¹) y 30 frascos *gerber* en inmersión parcial como se explicó anteriormente.

El medio de cultivo líquido se esterilizo en autoclave por 20 minutos a 120°C y 1.2 Kg/cm². El medio semisólido se le agrego phytagel y se disolvió en plancha de calentamiento y agitación (figura 21).

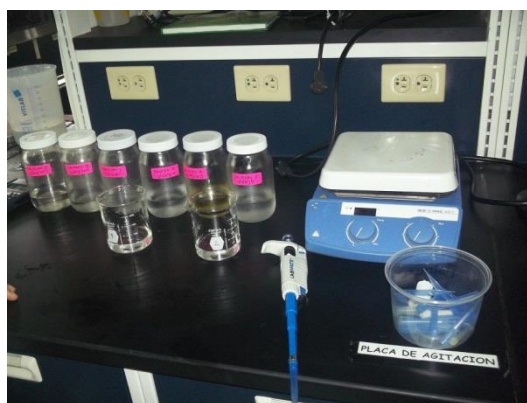


Figura 21. Preparación de medios de cultivo.

4.5. Instalación de biorreactores BIG

Se instaló un Sistema de Inmersión Temporal por gravedad (BIG) en frascos de vidrio de 1 L (18 cm de alto y 9 cm de diámetro), con tres repeticiones, cada una

con 500 ml de medio de cultivo, y 50ml por explante. Cada biorreactor de gravedad consta de: 2 frascos de vidrio de 1 L y tapas de polycarbonato con empaque, 4 *fiting* de doble *o-ring*, 2 filtro *milipor* de 0.2 μm , manguera flexible de silicona recubierta con aluminio y 1 esponja del diámetro del frasco y 2 cm de alto.

Una vez armados los biorreactores equipados se embolsan en dos bolsas de plástico y esterilizan en autoclave por 20 minutos a 120°C y 1.2 Kg/cm², los filtros se cubren con papel aluminio en las entradas (figura 22).

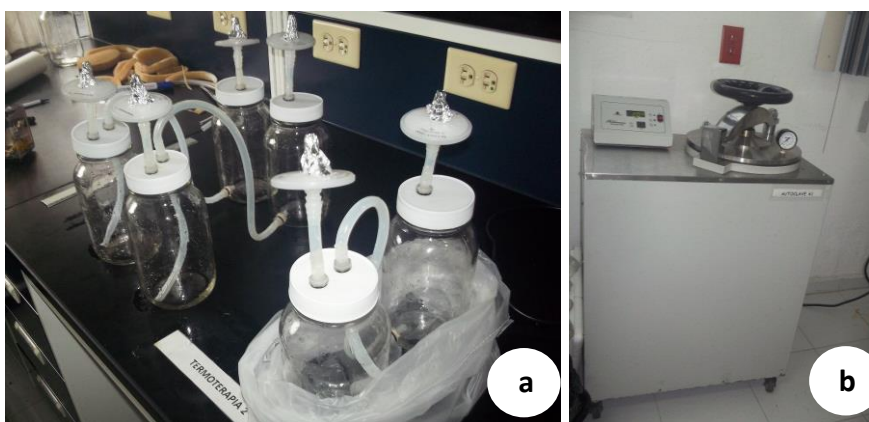


Figura 22. Instalación, a) biorreactores BIG equipados y b) autoclave.

4.6. Comparación de sistemas de micropropagación

Se compararon los tres sistemas de micropropagación: semisólido, inmersión parcial y SIT en BIG, midiendo las siguientes variables fisiológicas; altura de los explantes, considerando un explante como un conjunto de nuevos brotes,

número de nuevos brotes por explante (tasa de multiplicación), longitud de los brotes, número y longitud de raíces.

Se sembraron; 5 frascos *gerber* con medio de cultivo semisólido, 30 frascos *gerber* con explantes en inmersión parcial (Venkatachalam y Bhagyalakshmi, 2008) y 3 biorreactores de inmersión temporal por gravedad BIG.

4.7. Determinación de frecuencia del BIG

Con la finalidad de determinar la frecuencia de inmersión adecuada, tres frecuencias fueron evaluadas (cada 4, 6, y 8 horas), con un tiempo de inmersión de 2 minutos (figura 23). Tres repeticiones por frecuencia, con 500ml de medio de cultivo por biorreactor y 5ml por explante.



Figura 23. Biorreactores instalados en frecuencias de 4, 6 y 8 horas.

4.8. Comparación del BioEdUACH con los otros tratamientos

Se compararon los cuatro sistemas de micropropagación (semisólido, inmersión parcial y BIG) que se establecieron y evaluaron previamente en el Colegio de Posgraduados, Campus Córdoba durante 71 días, con 5 repeticiones del

BioEdUACH (figura 24), establecido en el laboratorio de Cultivo de tejidos de la Universidad Autónoma Chapingo, durante 31 días y midiendo las variables fisiológicas; número de nuevos brotes, longitud de los brotes.



Figura 24. Sistema de micropropagación con BioEdUACH.

4.9. Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar, los datos fueron analizados con un análisis de varianza (ANOVA), prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) con el programa SPSS 11.5 para programas de Windows (SPSS Inc., Chicago, IL). Las condiciones del cultivo fueron 24 ± 2 °C, 50 ± 5 % de humedad relativa, y luz fluorescente permanente.

4.10. Comparación de precios BioEdUACH y BIG

Se realizó una comparación de los costos de instalación de cada uno de los dos biorreactores de inmersión temporal, con todos los elementos constitutivos sin incluir la estructura auxiliar. A la vez, fue estimado un estudio económico exploratorio proyectado a 5 años con 100 biorreactores BioEdUACH con una tasa de multiplicación esperada de 20 explantes nuevos de *Laelia speciosa* K.S. por explante sembrado. La proyección financiera incluyó inversiones fijas,

diferidas, costos de operación, y parte de éstos, el capital de trabajo. La tasa de actualización estimada fue del 15% considerando el nivel de inflación de 5% y un premio al riesgo de 10%.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1. BioEdUACH

La primera versión del prototipo que se diseñó y construyó, no funcionó por varias razones; el prototipo no tenía aislamiento total de la pecera donde se almacenó el medio de cultivo, por lo que en la prueba que se le realizó el medio se contaminó, adicional a eso se le dio un recorrido excesivo al medio, con paso por bomba, filtros de paso 1 y osmosis inversa y lámpara UV.

Otras desventajas detectadas motivo por el cual no se utilizó este prototipo fueron: la preparación de un volumen grande de medio de cultivo y contenerlo todo en un solo recipiente, facilitando que se contamine todo el medio, las cribas al parecer resultaron ser muy grandes para el tamaño de los explantes y no se filtró debidamente el aire que entraba a las cribas. Y finalmente el costo de construcción fue elevado, porque está compuesto por muchas partes como se muestra en la figura 25a.

La segunda versión del BioEdUACH, diseñado y construido con materiales sencillos comerciales con su estructura metálica y aditamentos, ubicado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo como se muestra en la figuras 25b y 26.



Figura 255. BioEdUACH, a) primera versión b) segunda versión.



Figura 26. Prototipo de inmersión temporal, a) BioEdUACH b) sistema neumático, c) sistema de iluminación.

Los tiempos programados para las cuatro estaciones del temporizador (figura 26) se presentan en el cuadro 4 y 5, y se muestran en la figura 27. El temporizador se debe conectar a una fuente de voltaje de corriente alterna, tiene una pila de litio CR2032 para mantener el programa en la memoria

durante cortes de electricidad. Cada hora de inicio de los programas A y B con las cuatro estaciones, comienza con la estación 1 y sigue sucesivamente hasta la 4, teniendo dos tiempos de inmersión uno al final y otro al final de cada ciclo.

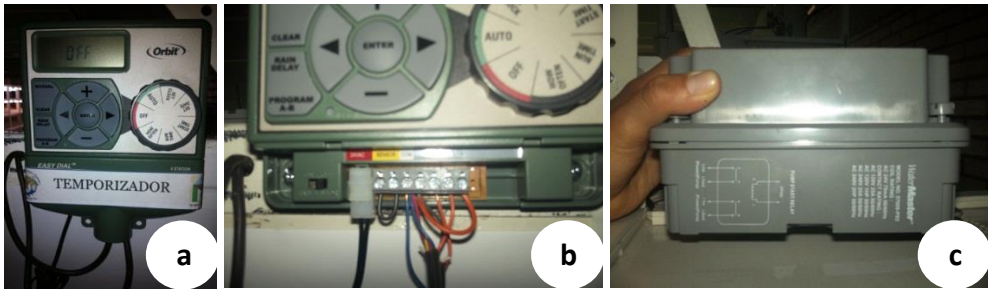


Figura 27. Control de activación, a) temporizador, b) estaciones y c) relevador.

Cuadro 4. Tiempos de funcionamiento de las estaciones del temporizador.

Estación 1	Estación 2	Estación 3	Estación 4
Electroválvula solenoide	Lámpara germicida	Luz LED roja y azul	Electroválvula solenoide
1 min	1 min	60 min	1 min

Cuadro 5. Horas de inicio de los programas del temporizador y de inmersión.

Día		Noche	
A1 - 2:45 am	3:47am	B1 - 2:45 pm	3:47pm
A2 - 5:45 am	6:47 am	B2 - 5:45 pm	6:47 pm
A3 - 8:45 am	9:47 am	B3 - 8:45 pm	9:47 pm
A4 - 11:45 am	12:47 am	B4 - 11:45 pm	12:47 pm

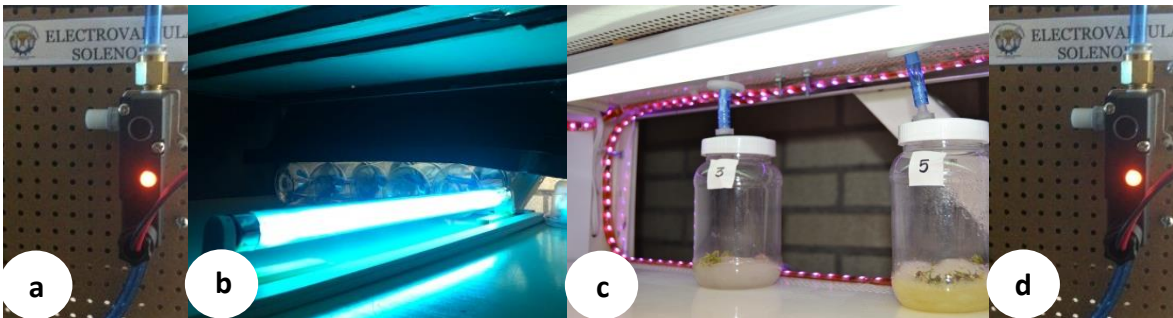


Figura 28. 4 Estaciones del temporizador, a y d) válvula solenoide, b) lámpara germicida para el medio de cultivo c) luz LED roja y azul.

La intensidad de iluminación obtenida durante el fotoperiodo con lámparas fluorescentes, combinadas con LED's cálida, tira LED's azul y roja fue 2480 Luxes, adecuado para la micropropagación in vitro.

El sistema neumático equipado y en orden de funcionamiento se ilustra en las siguientes fotografías (figuras 29 y 30). El regulador de presión a la entrada de aire en el prototipo se fijó en 5 psi (Lb.pulg⁻²).

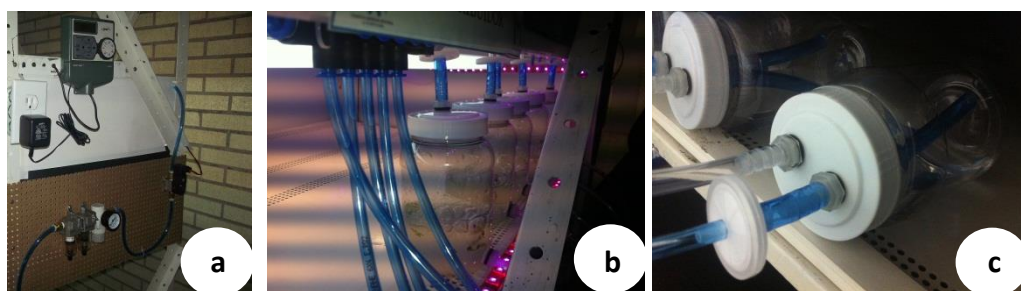


Figura 29. BioEdUACH, a) vista lateral, b) conexión del sistema neumático, c) frasco con medio de cultivo.

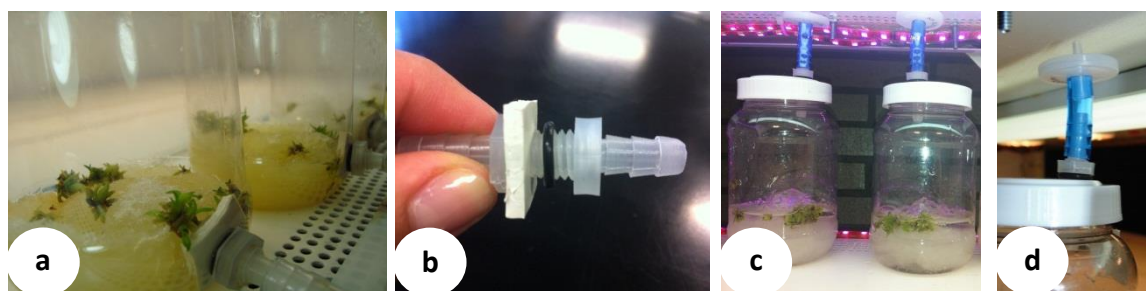


Figura 30. Frasco con explantes, a) entrada por *fitting*, b) *fitting*, c y d) salida del aire por filtro *milipor*.

5.2. Establecimiento de los cultivos asépticos en el BioEdUACH

La preparación de los frascos para el medio de cultivo y explantes fue hecha manualmente como se presenta en la siguiente figura.

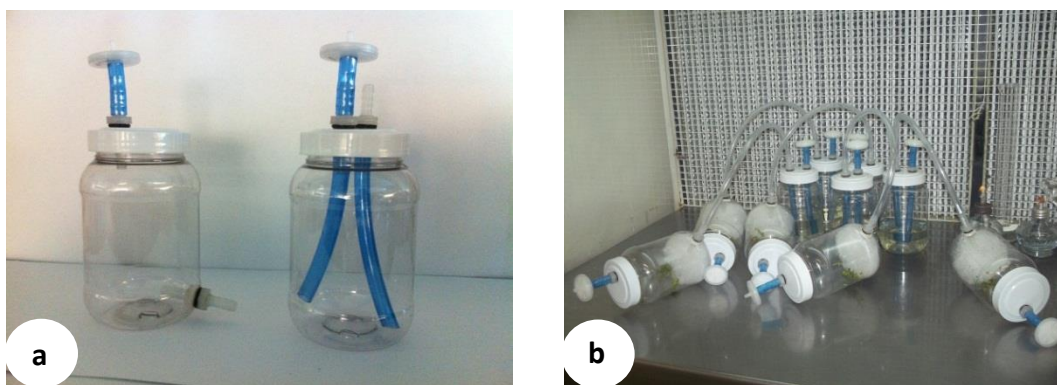


Figura 31. Frascos para medio de cultivo y explantes, a) sin instalar, b) instalados y con explantes.

Después de 31 días de multiplicación de los explantes de orquídea *Laelia speciosa* K.S., se comprobó que funciona mejor la esponja convencional de poliuretano que la guata como soporte para los explantes, debido a que la guata es más porosa y los explantes se anclan, evitando el movimiento con la inmersión y el burbujeo, que estimula la generación masiva de brotes y favoreciendo por el contrario la dominancia apical que no es recomendable porque ocasiona un número menor de nuevos brotes. Con $8,4873 \pm 0,35405$ nuevos brotes y longitud de brotes en milímetros $9,5238 \pm 0,41177$ (Media $\pm$ Error estándar) (figura 32).



Figura 32. Explante de BioEdUACH después de 31 días de multiplicación (escala 1cm).

Debido al sobredimensionamiento de los orificios para los *fitting* en los frascos con explantes se presentó contaminación como se muestra en la siguiente figura.

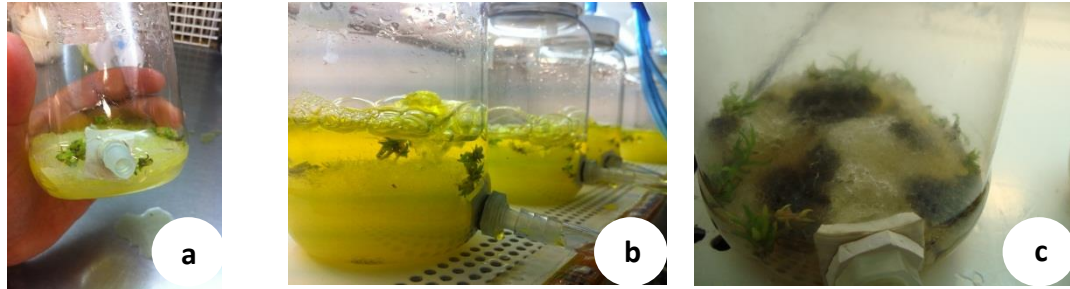


Figura 33. Frasco con explantes, a) orificio para *fitting* sobredimensionado, b) fugas, c) contaminación.

Cabe resaltar también, que las condiciones externas al BioEdUACH no fueron las mejores, porque tanto las paredes, el piso y el techo no era blancos ni lisos (figura 34), por lo que no se garantizaba la asepsia que se necesita para poner allí los BioEdUACH, que por su funcionamiento no son sistemas completamente cerrados ya que tienen un filtro de salida de aire en la parte superior por el que también pueden contaminarse.



Figura 34. Ambiente exterior al BioEdUACH.

Para la contaminación que se presentó se recomienda utilizar la esterilización con luz UV, nanopartículas de plata u otros métodos de desinfección que no perjudiquen a los explantes, así como mejorar las condiciones externas del lugar donde está el gabinete y hacer los orificios más pequeño (7mm) para los *fitting* de los frascos con explantes.

La duración de inmersión en medio de cultivo líquido de los explantes es quizás el valor de mayor atención en los SIT para las especies propagadas *in vitro* (Alvard *et al.*, 1992). Debido a esto, se deben hacer cambios en la programación del BioEdUACH si se desea probar en otra especie de interés.

5.3. Establecimiento de cultivos asépticos en el COLPOS y comparación de los sistemas de micropropagación

Primero se evaluaron los tres sistemas de micropropagación establecidos en el Colegio de posgraduados, Campus Córdoba; semisólido, inmersión parcial y sistema de inmersión temporal por gravedad BIG con explantes de *Laelia speciosa* K.S., durante 71 días (figura 35).

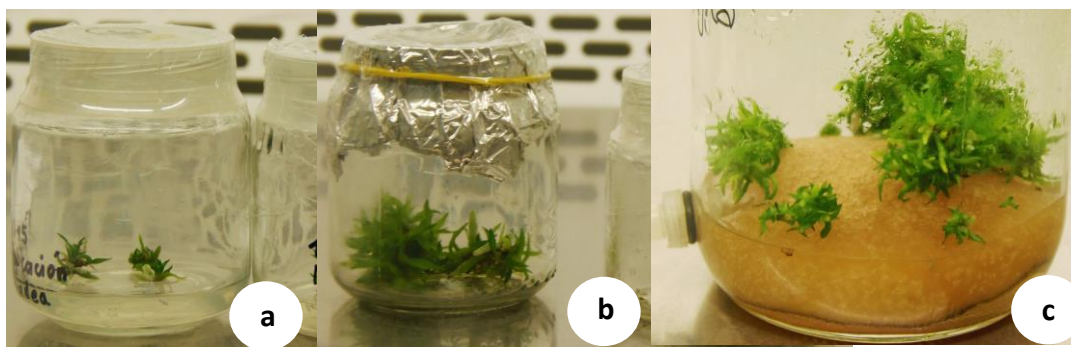


Figura 35. Micropropagación a) semisólido, b) inmersión parcial, c) BIG.

Los explantes sembrados del mismo tamaño (0.5 cm) en los diferentes tratamientos, al pasar 31 días ya mostraban diferencias claras (figura 36), siendo el mejor el tratamiento BIG por tener los mejores resultados en los parámetros medidos, y el peor fue el tratamiento de frascos *gerber* en medio de cultivo semisólido, solidificado con *phytagel*[®]. Estos resultados son similares a los encontrados por Ramos-Catellá, *et al.*, (2014) en vainilla y sistema de inmersión temporal RITA[®] y Bello *et al.*, (2010) con sistema de inmersión temporal BioMINT[™] en chile habanero y análisis de estadístico para diferencias significativas t-Student, $P \leq 0.05$.



Figura 36. Explantes de *Laelia speciosa* K.S., después de 31 días de multiplicación *in vitro*; a) medio semisólido, b) inmersión parcial, y c) BIG. (Escala 1cm).

Newton-Scheidt *et al.*, (2009), trabajando con piña (*Ananas comosus* L. Merrill) encontraron que el sistema de micropropagación en medio semisólido fue inferior en su tasa de multiplicación a dos sistemas de inmersión, RITA[®] y B.I.B[®], Noceda *et al.*, (2012) en plátano (*Musa AAB*) y Castro *et al.*, (1999) en banano tuvieron el mismo resultado.

La tasa de multiplicación del BIG fue de $28,7857 \pm 3,68570$ a brotes nuevos por explante sembrado, presentando diferencias significativas en el análisis

estadístico ANOVA con una vía, Tukey y $P=0.5$, mientras la de inmersión parcial y medio de cultivo semisólido fue muy similar con $10,3333\pm1,29352b$ y $9,5714\pm2,09145b$ respetivamente, 2.8 veces menos brotes por explante sembrado aproximadamente (cuadro 6). Comprobando que el sistema de inmersión temporal, para este caso con tiempo de inmersión de 2 minutos y frecuencia de 4 horas (figura 37 y 38) ayuda a potencializar la tasa de multiplicación en la micropropagación *in vitro*.

Cuadro 6. ANOVA de sistemas de micropropagación.

Tratamiento	Numero de brotes (M $\pm$ EE)	Longitud de explantes (M $\pm$ EE) mm	Longitud de brotes (M $\pm$ EE) mm	Numero de raíces (M $\pm$ EE)	Longitud de raíces (M $\pm$ EE) mm
Semisólido	9.57 $\pm$ 2.09b	18.86 $\pm$ 2.19b	6.85 $\pm$ 0.28c	0.71 $\pm$ 0.13b	3.77 $\pm$ 0.44b
Inmersión parcial	10.33 $\pm$ 1.29b	21.22 $\pm$ 1.13b	8.86 $\pm$ 0.26b	1.16 $\pm$ 0.18ab	7.22 $\pm$ 0.40a
BIG	28.79 $\pm$ 3.69a	28.50 $\pm$ 1.93a	11.20 $\pm$ 0.16a	1.57 $\pm$ 0.09a	4.38 $\pm$ 0.17b

M= Medias, EE=Error Estándar. Medias con letras diferentes son significativamente diferentes (Tukey, $P\leq0.05$).

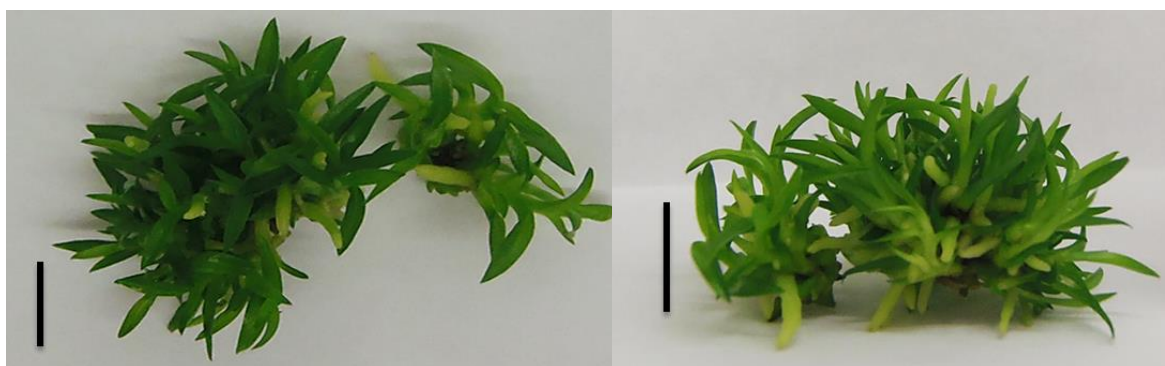


Figura 37. Explantes después de 71 días fases de multiplicación y primera parte de las fases de elongación y enraizamiento en BIG (escala 1cm).



Figura 38. Brotes después de 71 días de multiplicación en BIG (escala 1cm).

Para la longitud del explante, longitud de brotes y número de raíces, se conservó el mismo orden que en la tasa de multiplicación, con mejores resultados para el BIG, seguido la inmersión parcial y por último el sistema semisólido, aunque la inmersión parcial se clasificó en los dos grupos $1,1640 \pm 0,18217ab$ en el número de raíces, en la última variable morfológica, la longitud de raíces el mejor tratamiento fue el de inmersión parcial $7,2197 \pm 0,40345^a$, con respecto a $4,3836 \pm 0,17003b$ del BIG y $3,7701 \pm 0,43770b$ del medio semisólido.

En los BIG también se observó organogénesis indirecta o presencia de callo, tejido aún indiferenciado (figura 39). Por el tiempo que duró el experimento se alcanzó la multiplicación, y adicionalmente la primera parte de las fases de elongación y enraizamiento. En próximos experimentos se debe medir adicional a los parámetros fisiológicos medidos, el contenido de clorofila y carotenoides para tener otro parámetro importante de comparación entre los sistemas que va a influir mucho en las fases *ex vitro* de aclimatación y establecimiento en campo.

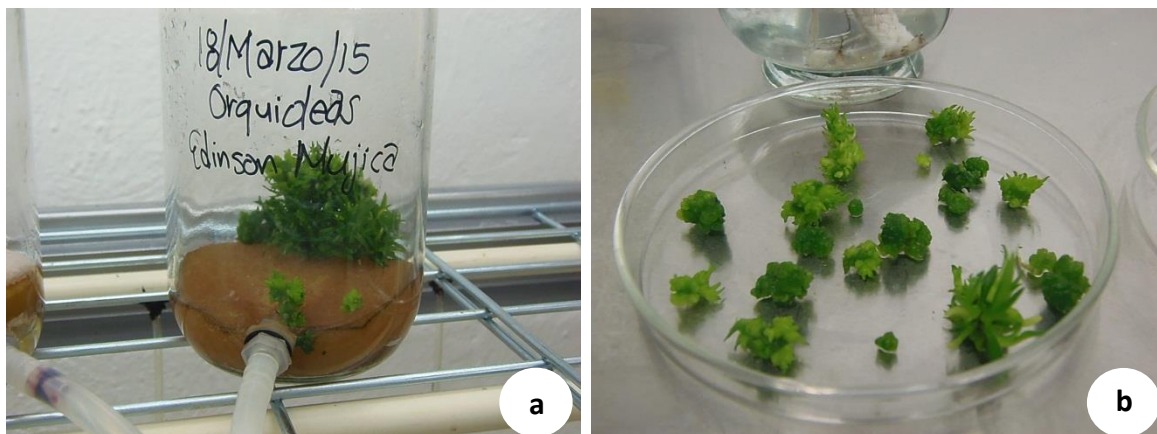


Figura 39. Explantes de BIG, a) *in vitro*, b) organogénesis somática directa e indirecta.

En el Colegio de Posgraduado se han realizado otros trabajos de investigación con sistemas de inmersión temporal, principalmente con el RITA, por ejemplo Vázquez, (2014) y Méndez (2014).

5.4. Determinación de frecuencia del BIG

Se sembraron 9 BIG en tres frecuencias de inmersión diferentes; cada 4, 6 y 8 horas, con el mismo tiempo de inmersión 2 minutos. La mejor frecuencia fue la de cada 4 horas por tener la mejor tasa de multiplicación y longitud de raíces ($2,6970 \pm 0,30922$ y $4,4000 \pm 0,74833$ respectivamente), sin embargo, el tratamiento de cada 6 horas, presentó los mejores resultados en longitud del explante y de los nuevos brotes ($12,0000 \pm 0.49441a$ y $9.1774 \pm 0,36325a$), en cuanto al número de raíces no hubo diferencias significativas entre los tres tratamientos, sin embargo la que fue mayor en el tratamiento de cada 6 horas $1,4706 \pm 0,15141$ (cuadro 7, figura 40).

Cuadro 7. ANOVA frecuencia de inmersión.

Tratamiento	Numero de brotes (M±EE)	Longitud de explantes (M±EE) en mm	Longitud de brotes (M±EE) en mm	Numero de raíces (M±EE)	Longitud de raíces (M±EE) en mm
Cada 4h	2.70±0.31a	11.52±0.46ab	8.01±0.28b	1±0.00	4.40±0.75a
Cada 6h	1.69±0.14b	1200±0.49a	9.18±0.36a	1,47±0.15	2.69±0.20b
Cada 8h	2.36±0.25ab	10.45±0.39b	7.28±0.26b	1±0.00	2.20±0.20b

M= Medias, EE=Error Estándar. Medias con letras diferentes son significativamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

En Vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) evaluando las frecuencias de inmersión cada 4, 8 y 12 horas, no encontraron diferencias significativas entre los tres tratamientos usando el sistema RITA[®]. En chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.), el mejor resultado fue con 2 minutos cada 8 horas usando el sistema BioMINT[™] (Bello-Bello *et al.*, 2010b). Sanka-Thomas *et al.*, (2008) obtuvieron buenos resultados con inmersiones de 1 minuto cada 6 horas.

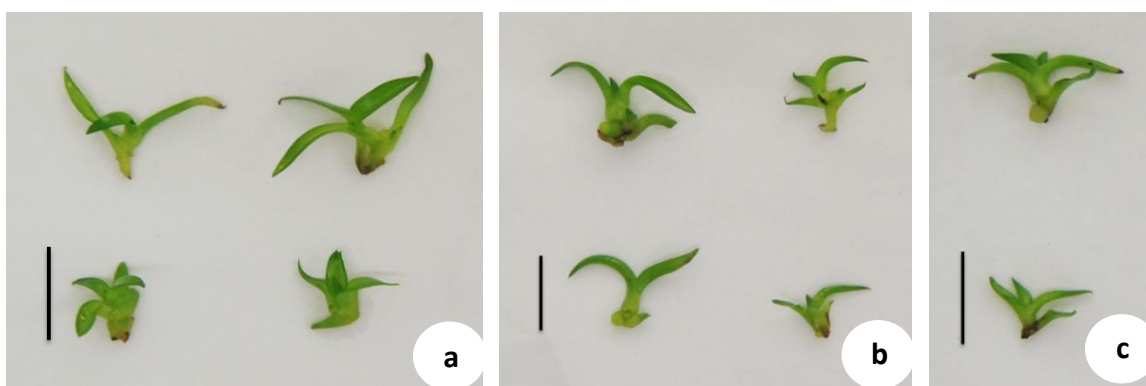


Figura 40. Brotes después de 25 días de multiplicación en frecuencias; a) cada 4 horas, b) cada 6 horas, c) cada 8 horas (escala 1cm).

Mordocco *et al.*, 2009, evaluaron caña de azúcar con inmersiones de 1 minuto cada 6, 12, 24 y 48 horas, pero no encontraron diferencias significativas en los

tratamientos de cada 12, 24 y 48 horas con tasas de multiplicación muy bajas 1.262 ± 30 , 1.449 ± 17 y 1.292 ± 12 respectivamente, durante seis semanas en RITA[®]. El mejor resultado con explantes de *Citrus deliciosa* fue 1 minuto cada 4 horas (Cabasson *et al.*, 1997).

El tiempo de inmersión y la frecuencia pueden ser los parámetros más importantes en la micropropagación de biorreactores, la densidad de explantes es otro factor que no ha sido investigado ampliamente. Se propone continuar este trabajo, comprobando la mejor densidad de siembra en la mejor frecuencia que ya fue determinada.

El experimento de Ramos-Castellá *et al.*, (2014), encontró que el mejor tratamiento de tres evaluados (25, 33.3 y 50 ml por explante) en vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks ex. Andrews) fue el de 25ml. En banano (*Musa* spp.), Roels *et al.*, (2005) encontraron que 30 ml de medio por explante obtuvo un máximo en la tasa de multiplicación, Castro *et al.*, (1999) solo evaluaron 50ml por explante, para 5, 10 y 15 explantes.

Se propone hacer otras investigaciones y comprobar los lineamientos de la micropropagación de orquídea *Laelia speciosa* K.S., para generar un manual que explique un procedimiento comprobado que dé éxito con esta especie y que contribuya a que se produzca comercialmente, así como se ha hecho por ejemplo en caña de azúcar (*Saccharum* spp.), (Caamal y Bello, 2014).

5.5. Comparación del BioEdUACH con los otros tratamientos

Los resultados del prototipo de inmersión temporal BioEdUACH fueron aceptables debido a que solo estuvo 31 días, mientras los tratamientos semisólido, inmersión temporal y BIG, tuvieron un tiempo de funcionamiento de 71 días. Los resultados se presentan en el cuadro 8 y la figura 41.

Cuadro 8. Comparación de los cuatro sistemas de microrpropagación.

Tratamiento	Numero de brotes (M±EE)	Longitud de brotes (M±EE) en mm
Semisólido	9.5714±2.09145b	4.5652±0.34906c
Inmersión parcial	10.3333±1.29352b	9.1818±1.21220ab
BIG	28.7857± 3.68570a	11.7143±0.55267a
BioEdUACH	8.4873± 0.35405b	9.5238±0.41177a

M= Medias, EE=Error Estándar. Medias con letras diferentes son significativamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

Este resultado indica que los fotoperiodos de luz roja y azul ayudaron a la aceleración de las dos variables medidas, a saber, numero de brotes y longitud de los mismos, aunque en otros experimentos realizados en el laboratorio con lámpara fluorescente roja (370 – 730 nm) se observó una mayor turgencia pero un menor número de brotes en comparación con la luz fluorescente blanca.

Sin embargo se presentó contaminación de los explantes, debido a que el orificio para el *fitting* del frasco con explantes no tuvo la medida adecuada. Cabe resaltar que no se observó hiperhidricidad en ninguno de los dos sistemas de inmersión temporal.

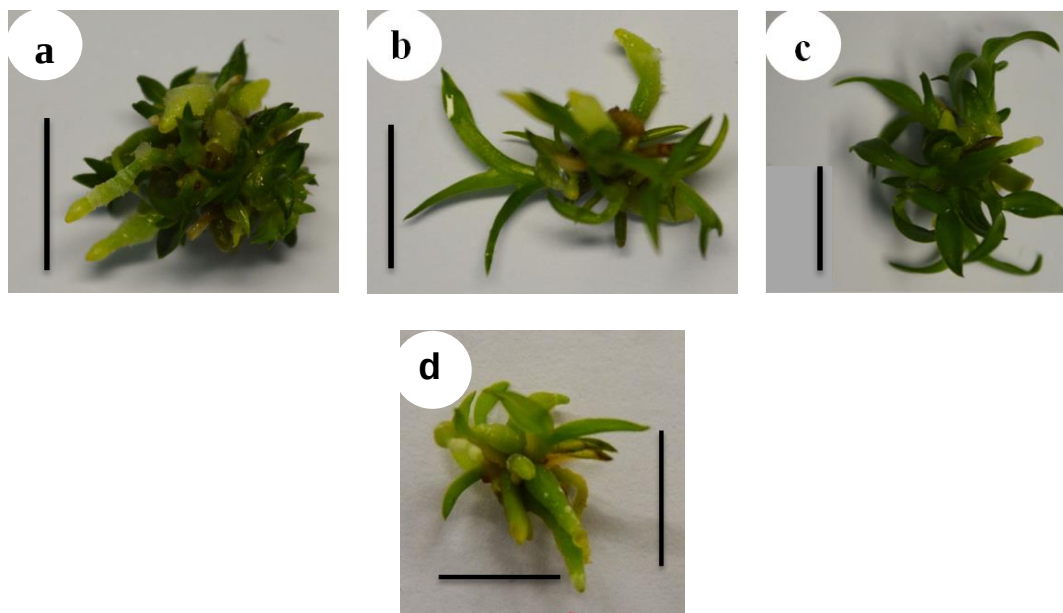


Figura 41. Explantes de *Laelia speciosa* K.S., después de 31 días de multiplicación *in vitro*; a) Medio semisólido, b) inmersión parcial, c) BIG, y d) BioEdUACH, (escala 1cm).

5.6. Comparación de precios BioEdUACH y BIG

En este trabajo se evaluaron 5 biorreactores, pero el prototipo actualmente tiene disponibilidad para 5 más y escalamiento de hasta 100. No se estimó la depreciación por el uso de los componentes del prototipo. Para el escalamiento se necesitarían más biorreactores (con todos sus componentes), además de manifold para las distribuciones y manguera de 10 y 6mm para el suministro de aire.

El costo total del nuevo prototipo, desglosado en el costo individual de cada una de sus componentes principales se describe en el cuadro 9.

Cuadro 9. Componentes principales del BioEdUACH.

Componente	Valor unitario	Cantidad	Subtotal
Unidad de acondicionamiento: Filtros de 5µm y 0.01µm y regulador de presión	1.500	1	1.500
<i>Fitting</i> autoclaveable con doble <i>oring</i>	40	20	80
Manguera neumática de 10mm	45	3.5	157.5
Manguera neumática de 6mm	25	3.5	87.5
Manguera plástica ¼"	2.5	1.5	3.75
Válvula solenoide de 3 vías y 2 posiciones	950	1	950
Manifold para manguera neumática	275	1	275
Tapon para conexión rápida de 10mm	20	1	20
Tapon para conexión rápida de 6mm	15	5	75
Compresor 24 Litros, 2HP	1319	1	1319
Temporizador (costo aprox)	700	1	700
Relevador	918.10	3	2754.3
Tira de 300 LED's RGB x 5m	857.76	1	857.76
Control remoto para tira de LED's RGB	379.32	1	379.32
Luces fluorescentes 28W T5	110.51	2	221.02
Luz cálida, lámpara de contacto x 3	542.24	5	903.73
Filtros <i>milipor</i> de 0.2µ x 50	40.38	20	80.76
Frasco de plástico de 500ml con empaque	10	10	100
Total			\$10.464.64

El compresor de aire (figura 42) tiene las características que se describen en el cuadro 10.

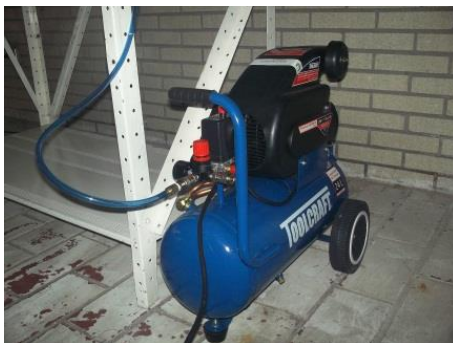


Figura 42. Compresor de aire TOOLCRAFT Modelo TC3555.

Cuadro 10. Parámetros del compresor de aire TOOLCRAFT Modelo TC3555.

Parámetro	Cantidad
Voltaje	127V
Frecuencia	60Hz
Velocidad	3400 rpm
Capacidad	24 L
Presión	113 PSI/ 8 Bar
CFM	6.3
Cabezal	Lubricado
Peso	25.5 Kg
Potencia	2HP / 1500W

El compresor es de capacidad suficiente para la cantidad de frascos utilizados con la posibilidad de escalarlo a un número mucho mayor de frascos. El sistema neumático tiene acople rápido de mangueras, que facilita su instalación y mantenimiento.

Los elementos del BIT son los mismos que se utilizan para el BIG, pero el BIT necesita dos electroválvulas (\$950 pesos mexicanos cada una), el BIG y el BioEdUACH utilizan la gravedad y requieren una sola electroválvula, razón por la cual los costos son menores. Sin embargo, en el BioEdUACH los precios de los frascos, los filtros *milipor* y la manguera son más económicos (cuadro 11), pero cabe mencionar que el volumen de los frascos es inferior también para el BioEdUACH, aunque, se espera que esta diferencia en volumen no arroje una diferencia significativa en el coeficiente de multiplicación entre los dos, cuando la propuesta de biorreactor ya sea un sistema validado.

Cuadro 11. Comparación de precios entre BioEdUACH y BIG.

BioEdUACH				BIG			
Material	Precio unitario	Cant.	Subtotal	Material	Precio Unitario	Cant.	Subtotal
Frasco de plástico de 0.5L	10	2	20	Frasco de vidrio de 1L	15	2	30
<i>Fitting</i> de doble o-ring	40	4	160	O-ring para tapa de plástico	15	2	30
Filtro <i>milipor</i> de 0.2µm	40.38	2	80.76	Conector pasamuro	35	2	70
Manguera de plástico de ¼"	2.5	1	2.5	O-ring pasa muro	4	2	8
				Abrazadera de muelle	4	8	32
				Filtro <i>milipor</i> de 0.2µm	90	2	180
				Manguera de silicón recubierta de platino	180	0.6	108
Total			263				458

Fuente: Empresas; Tecniproducos Orizaba, S.A de C.V, y Consultoría en diseño e innovación tecnológica CODITEC.

Se seleccionaron frascos de 500 mL de plástico debido a que es más económico, no hay riesgo de que se rompa y ocasione daño a las personas, es transparente permitiendo el paso de la luz y su volumen como tamaño, son adecuados para el desarrollo de los tejidos vegetales.

Las inversiones en activos fijos y activos diferidos son de un monto de \$ 104.712, los cuales se invertirán en el primer año del plan de negocios. En el transcurso de la vida útil del proyecto se ha calculado un presupuesto de

reinversiones de \$ 6.400 y el valor de rescate de los conceptos de inversión y reinversión al término de 5 años es de \$ 21.052 (Anexo 1, cuadro 1).

Los costos de operación incluyen los costos variables y los costos fijos. En los primeros se considera el monto proveniente del costo total de insumos por cada biorreactor, en función del programa de escalamiento, 40% primer año, 60% segundo año, 80% tercer año, 100% cuarto y quinto año. Los costos fijos incluyen los gastos de administración, como parte de los costos fijos, consisten en la contratación de un técnico especializado y un ayudante en general (Anexo 1, cuadro 2)

La estructura auxiliar; el sistema neumático y de iluminación se le proyecta una vida útil de 7 años pero se recomienda solo usarlo por 5 años. Las cosas que duran solo un año como son las lámparas fluorescentes, debido a que se deben estar cambiando se consideran costos variables.

Los costos para el funcionamiento de un sistema de inmersión temporal se pueden dividir en mano de obra, energía y reactivos. Los costos se elevan por la mano de obra por eso se eligió automatizar al mayor grado posible para disminuirlos, es decir utilizar un prototipo semiautomático que demanden menor mano de obra y medio de cultivo líquido para eliminar los ingredientes gelificantes y aunque no hizo parte de este trabajo se puedan esterilizar con compuestos químicos, por ejemplo nano partículas de plata, para prescindir también del autoclave.

Se estimó ciclos de multiplicación de explantes de *Laelia speciosa* K.S. de 45 días, con 20 explantes por biorreactor, 12.5 ml de medio por explante y una tasa de multiplicación de 25 plántulas por explante sembrado que es similar al observado en el BIG.

Para el costo de la energía se recurrió a la Comisión Federal de Electricidad (CFE) (Anexo 1, cuadros 3 y 4). Sus componentes se pueden comprar en el comercio local, con excepción de los filtros, y *fitting*. Los precios de los reactivos para el análisis económico se tomaron de cotizaciones de las empresas Reymon del 2015, y Ferandelh, S.A. de C.V de 2012 incrementadas un 30% para tener un costo actual aproximado (Anexo 1, cuadro 5).

Los ingresos de la empresa estarán constituidos por venta de plántulas de orquídea *Laelia speciosa* K.S. después de la etapa de multiplicación, se estima comercializar el 100% de la producción generada. Los volúmenes de producción y venta se estiman en el Anexo 1, cuadro 6.

El capital de trabajo se estima en un 90% de los costos totales de producción en virtud de la disponibilidad de recursos para la operación del sistema. La ventaja para el comprador radica en mejorar el precio de manera consolidada y la garantía en la comercialización para la recuperación del capital invertido. Del capital de trabajo calculado, se gestionará el diferencial de la aportación de capital (Anexo 1, cuadro 7).

El estado de resultados o estado de pérdidas y ganancias presenta números negros en los 2 años de operación del plan de negocios; por tratarse de una institución del estado (Anexo 1, cuadro 8).

El flujo de fondos (Anexo 1, cuadro 9) muestra los resultados finales de la actividad desde el inicio de sus inversiones hasta la recuperación del valor de rescate y el capital de trabajo bajo el escenario del cierre, con el fin de realizar la evaluación de los indicadores financieros. Los resultados de la evaluación financiera indican que el prototipo es rentable y por tanto, las inversiones realizadas se recuperan, la propuesta de producir y operar dicho prototipo **SE ACEPTA** a una tasa de actualización del 15%. La interpretación de los resultados es la siguiente:

Cuadro 12. Indicadores de la evaluación económica.

Indicador	Valor	Interpretación
Valor Actual Neto (VAN) a tasa de 15%	\$ 29,378	Durante la vida útil de 5 años del plan de negocios, se espera una ganancia a valor actual de \$ 29.378.00; es decir, se recuperan las inversiones y se obtiene dicho monto. La decisión es: si el VAN es igual o mayor a cero, el plan de negocios se acepta. Si es menor de cero, se rechaza.
Relación Beneficio/Costo (B/C)	\$1.06	Por cada peso que se invertiría en el plan de negocios es espera recuperar el peso y obtener una ganancia de 6 centavos a valor actual. La decisión es: para que el plan de negocios se acepte la relación B/C debe ser mayor a uno.
Tasa Interna de Rentabilidad (TIR)	21.39%	Por cada cien pesos invertidos en el plan de negocios, se espera una ganancia de 21 pesos, 39 centavos. El plan de negocios se acepta porque la TIR es mayor a la tasa de actualización. A la tasa del 21.39%, se recuperan todas las inversiones durante la vida útil de 5 años.

Después de evaluar nuevamente el prototipo y comprobar su funcionalidad, puede hacerse un estudio económico completo, utilizando el coeficiente de

multiplicación de la especie y los costos reales, con el fin de determinar su rentabilidad. Por lo anterior se estimaron las inversiones fijas, diferidas y costos de operación y un programa de producción y venta, con un escalamiento de 100 biorreactores (100%) en 5 años pero sin incluir mercadeo del producto.

El análisis económico que se realizó con las observaciones anteriormente explicadas se presenta en el Anexo 1.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se diseñó y construyó el prototipo BioEdUACH con materiales disponibles en el mercado el cual podrá ser construido o adquirido por los usuarios en forma más económica que el BIG y BIT de acuerdo a la comparación de precios de instalación mostrada.

Se hicieron mejoras a una primera versión del prototipo con un sistema neumático para que no se contaminara el cultivo fácilmente. El cual mejoro su operación y dio resultados aceptables, pero se deben hacer más pruebas de funcionamiento con tiempo mayor esperando mejor respuesta de los tejidos.

Los resultados del BIG son mejores que los del BioEdUACH debido a que los parámetros medidos (tasa de multiplicación y longitud de brotes de *Laelia speciosa* K.S.) son mayores en el BIG. Se recomienda aislar El BioEdUACH mejorando las condiciones ambientales necesarias para el cultivo *in vitro* presentes en el laboratorio.

La mejor frecuencia es cada 4 horas con un tiempo de inmersión de 2 minutos en BIG con explantes de *Laelia speciosa* K.S. La frecuencia de cada 6 horas presentó los mejores resultados en la longitud de los brotes, por lo que se recomienda utilizar la frecuencia de cada 4 horas para multiplicación y la de 6 para la fase de elongación.

Se comprobó que los SIT es el mejor método de micropropagación vegetal en la actualidad de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo.

7. BIBLIOGRAFIA

Abdelnour-Esquivel Ana y Vicent Escalant Jean. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos. CATIE, 48 p.

Aguirre León T. R. 2001. Micropropagación de *Euchile citrina* (Orchidaceae). Tesis de licenciatura, Facultad de Biología, U.M.S.N.H. 57 p.

Alvard D, Cote F y Teisson C. 1993. Comparison of methods of liquid culture for banana micropropagation, effects of temporary immersion of explants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 32. Pp. 55-60.

Aragón C. E, Escalona M, Capote I, Pina D, Cejas I, Rodríguez R, Cañal M. J, Sandoval J, Roels S, Debergh P, Gonzalez-Olmedo J. 2005. Photosynthesis and liquid metabolism in plantain (Mus AAB) plantlets growing in temporary immersion bioreactors and during ex vitro acclimatization. In Vitro Cell Dev Biol-Plant 41. Pp 550-554.

Ávila-Díaz I, Garibay-Orijel R, Magaña-Lemus R. E, Oyama K. 2013. Molecular evidence reveals Fungi Associated Within the epiphytic orchid *Lealia speciosa* (HBK) Schltr. Botanical Sciences 91. Pp. 523-529.

Bayman P, Mosquera-Espinoza A. T., & Porras-Alfaro A.. 2011. Mycorrhizal relationships of Orchidaceae for Biocontrol of Root Rots in: D Havklin-Frenkeland F. Belanger.

Bello-Bello J. J, Canto-Flick A, Balam-Uc E, Gómez-Uc E, y Robert M. L. 2010. Improvement of In Vitro Proliferation and Elongation of Habaner Pepper Shoots

(*Capsicum chinense* Jacq.) by Temporary Immersion. HortScience 45(7). Pp 1093-1098.

Bello-Bello J. J, García-García G. G, y Iglesias-Andreu L. 2015. Conservación de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks.) bajo condiciones de lento crecimiento *in vitro*. Rev. Fitotec. Mex. Vol.38 (2). Pp 165-171.

Caamal-Velazquez J. H. y J. J. Bello-Bello. 2014. Micropropagación de caña de azúcar (*Saccharum spp.*). Colegio de Posgraduados y Fundación Produce Campeche, México, primera edición, 23p.

Cabasson C, Alvard D, Dambier D, Ollitrault P y Teisson C. 1997. Improvement of Citrus somatic embryo development by temporary immersion. Plant Cell Tissue and Organ Culture 50. Pp 33-37.

Castro D., Díaz J. y Montoya N. 1999. Propagación clonal de bananos en Biorreactores de Inmersión Temporal, Colombia, AUGURA, pp:44-48.

Chase, M. W, Freudenstein J. V, Cameron K. M. Y Barret R. L.. 2003. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification.

Colmenares M, Gimenez C. 2003. Multiplicación *in vitro* *Musa spp.* Mediante sistema de inmersión temporal. Rev. Fac. Agron. (LUZ) 20. Pp 468-477.

Comité de Conservación de la Asociación Mexicana de Orquideología. México, D.F. Comunicado del 29 de abril de 2014.

Curso internacional “Automatización y uso de biorreactores para la micropropagación de plantas”. 2014. Colegio de posgraduados Campus Córdoba y Universidad Veracruzana. Córdoba, Veracruz.

Cruzat R. 2009. Sistema de inmersión Temporal. Fundación para la innovación agraria, Ministerio de la agricultura, Chile, pp:5-37.

De Bartolini B. C, Lallana Victor H. 1995. Traducción del inglés: Términos comúnmente usados en cultivo de tejidos. Cátedra de fisiología vegetal. Universidad Nacional de entre Ríos. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Oro Verde, Paraná, entre Ríos.

Dressler. R. L. 2005. How many orchid species? *Selbyana* 26: 155-158.

Ducos J. P, 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. Bio.-Plant* 43. Pp 652-659.

Duong T. N, Hong L. T. A, Watanabe H, Goi M, Tanaka M. 2003. Efficiency of a novel culture system by using light-emitting diode (LED) on in vitro and subsequent growth of micropropagated banana plantlets. *Acta Horti* 616. Pp 121-127.

Escalona M, Lorenzo JC, Gonzalez B, Danquita M, Desjardins Y & Barroto CG. 1999, Pinneapple (*Ananas Comosus* L. Merr), micropropagation in temporary immersion system. *Plant Cell Rep.* 18:743-178.

Escalona M, Samson G, Barroto C, Desjardins Y. 2003. Physiology of effects of temporary immersion bioreactors on micropropagated pineapple plantlets. In *Vitro Cell. Dev. Biol-Plant* 39. Pp 651-656.

Espinosa P, Lorenzo J. C, Iglesias A, Yabor L, Menendez E, Borroto J, Hernandez L, Arencibia. 2002. Production of pineapple transgenic plants assisted by temporary immersion bioreactors. *Plant Cell Rep* 21. Pp 136-140.

Etienne H., and Berthouly M. 2002. Review Temporary systems in plant micropropagation. *Journal Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69, 215-231.

Etienne H, Bertrand B, Georget F, Lartaud M, Montes F, Dechamp E, Verdeil J-L, Barry-Etienne D. 2013. Development of coffee somatic and zygotic embryos to plants differs in the morphological, histochemical and hydration aspects. *Tree physiology Advance*. Pp 1-14.

FAO/IAEA. 2004. Low cost options for tissues culture technology in developing countries Proceedings of a Technical Meeting organized by the Joint Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture and held in Vienna, 26-30 August 2002 February 2004.

Ficha técnica. Large temporary immersion bioreactor MATIS[®]. CID Plastiques, Cirad, Francia.

Ficha técnica RITA[®].2005. Vitropic S.A. Francia.

Ficha técnica. SETIS[™]. Biorreactor Temporary immersion systems in plant micropropagation. Duchefa Biochemie B.V y product of Vervit, Belgium.

Folta M Kevin, Koss L Lawrence, McMorro Ryan, Kim Hyeon-Hye, Kenitz Dustin, Wheeler Raymond and Sager C John. 2005. Design and fabrication of adjustable red-green-blue LED light arrays for plant research. BCM Plant Biology, BioMed Central Ltd, 5, 17.

Freuler J. M. 2007. Orquídeas. 1 ed. Buenos Aires.

Georgiev Vasil, Schumann Anika, Pavlov Atanas y Bley Thomas. 2014. Review. Temporary immersion system in plant biotechnology. Journal engineering in life Sciences.00,1-15.

Girón Gonzalez E. 2012. LEDs for General and Horticultural Lighting. Leganés, Madrid.

González-Olmedo J. L, Fundora Z, Molina L. A, Abdulnour J, Desjardins Y, Escalona M. 2005. New contributions to propagation of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) in temporary immersion bioreactors. In Vitro Cell Dev Biol-Plant 41. Pp 87-90.

Hágaster, E., M. A. Soto Arenas, G.A. Salazar Chavez, R. Jiménez Machorro, M. A. Lopez Rosas y R.L Dressler. 2005. Las orquídeas de México. Instituto Chinoín, México.

Hanhineva K, Kokko H, Kärenlampi S. 2005. Root regeneration from leaf explants of five strawberry (*Fragaria x Ananassa*) cultivars in temporary immersion bioreactor system. In Vitro Cell Dev Biol-Plant 41. Pp 826-831.

Hanhineva K. J, Kärelampi S. O. 2007. Production of transgenic strawberries by temporary immersion bioreactor system and verification by TAIL-PCR. BioMedCentral (BMC) Biotechnology.

Hartmann Hudson T. y Kester Dale E. 2001. Propagación de plantas, principios y prácticas (Titulo original: PLANT PROPAGATION, Principle and practices, 1987). Octava reimpression, México, compañía editorial continental.

Hvoslef-Eide A, and Munster C. 1998. Somatic embryogenesis of *Cyclaman persicum* Mill in bioreactors. Comb. Proc. Int. Plant Prop 47. Pp 377-382.

Jiménez Elio, Pérez Naivy, de Feria M, Barbón R, Capote A, Chávez M, Quiala E, Pérez J. C. 1999. Improved production of potato microtubers using a temporary immersion system. Plant Cell Tissue and Organ Culture 59. Pp. 19-23.

Kim H. H, Goins D. D, Wheeler R. M, Sager J. C. 2004. Green light supplementation for enhanced lettuce growth under red and blue light emitting diodes. HortScience 39. Pp 1617-1622.

Lara A, Mosqueda O, y González-Olmedo J. 2004. Determinación de los efectos del Pectimorf y C-751 sobre la multiplicación de brotes de *Anthurim andreanum* propagados en biorreactores de inmersión temporal. Revista Ceiba, Volumen 45 (2). Pp. 121-128.

Li H, Xu Z, Tang C. 2010. Effects of light-emitting diodes on growth and morphogenesis of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plantlets in vitro. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 103: p. 155-163.

Lorenzo JC, Gonzalez BL, Escalona M, Teisson C, Espinosa P & Borroto C. 1998. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 54:197-200.

Martre P, Lacan D, Just Daniel, Teisson C. 2001. Physiological effects of temporary immersion on *Hevea brasiliensis* callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 67. Pp 25-35.

Méndez Alegría Annet Yamili. 2014. Uso de recipientes de inmersión temporal automatizados (RITA®) para la micropropagación de vainilla empleando nanopartículas de plata. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), Facultad de Ingeniería, Colegio de Ingeniería Industrial. México. Pp 47.

Mehrotra S, Manoj G, Arun K, Bhartendu M. 2007. Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress toward commercialization. *African Journal of Biotechnology* 6 (13). Pp 1484-1492.

Montes-López J. J y Rodríguez de la O. J. L. 2001. Establecimiento y brotación in vitro de yemas axilares y ápices de Ginkgo (*Ginkgo biloba* L.). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 7(1). Pp 49-59.

Mordocco A. M, Brumley J. A and Lakshmanan. 2009. Development of a temporary immersion system (RITA) for mass production of sugarcane

(*Saccharum* spp. Interspecific hybrids). In Vitro Cell Dev. Biol.Plant 45. Pp450-457.

Mulet Hing Mónica, de la Cruz Licea Gerardo. 1999, Sistema de inmersión temporal automatizado, Tecnología Química, Colombia, Vol. 19, pp:22-24.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15:471-497.

Murguía G. J. 2007. Producción de orquídea, anturio, gardenia y ave de paraíso. In: Memoria del curso de capacitación. Universidad Veracruzana. Fundación Produce Veracruz A.C. 18-19 de mayo. Fortín, pp. 49.

Navarro P. V. 2013. Analisis de la utilización de luz emitida por lámparas de diodo (LEDs) en la producción in vitro para la obtención de semillas prebásicas de *Solanum tuberosum*. Trabajo final de Ingeniería en Producción Agropecuaria, Facultad de Ciencias Agrarias. Biblioteca digital Universidad Católica Argentina.

Newton-Scheidt G, Haruko-Arakaki A, Sugitani Chimilovski J, Franke Portella A. C, Rigon-Spier Michele, Lorenci-Woiciechowski A, Biasi L. A y Soccol C. R. 2009. Utilization of the Biorreactor of immersion by Bubbles at the Micropropagation of *Ananas comosus* L. Merrill. *Brazilian archives of biology and technology*, an international journal Vol. 52, Special Number. Pp 37-43.

Nhut D. T, Hong LTA, Watanabe H, Goi M, Tanaka M. 2000. Growth of banana plantlets cultures in vitro red and blue lightemitting diode (LED) irradiation source. Acta Horti 575. Pp7-23.

Niemenak N, Katja Saare-Surminski, Rohsius C, Omokolo N. D, Lieberei R. 2008. Regeneration of somatic embryos in Theobroma cacao L. in temporary immersion bioreactor and analyses of free amino acids in different tissues. Plant Cell Rep. Cell Biology and morphogenesis

Noceda Carlos, Vargas Alfonso, Roels Sophie, Cajas Inaudis, Santamaria Estrella, Escalona Maritza, Debergh Pierre, Rodriguez Roberto, Sandoval Jorge, Cañal María Jesús. 2012. Field performance and (epi)genetic profile of plantain (Musa AAB) clone "CEMSA 3/4" plants micropropagated by temporary immersion. Journal Scientia Horticulturae 146, 65-75.

Pérez Molphe Balch E. M, Ramirez Malagon R, Nuñez Palenius H. G y Ochoa Alejo N. 1999. Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad Autónoma de Aguas Calientes.

Pérez A, Nápoles L, Lorenzo J. C, Hernández M. 2003. Protease excretion during pineapple micropropagation in temporary immersion bioreactors. In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 39. Pp 311-315.

Pérez M, Bueno M, A, Escalona M, Toorop P, Rodríguez R y Cañal M de J. 2013. Temporary immersion system RITA for the improvement of cork oak somatic embryogenic cultures proliferation and somatic embryo production. Journal Trees 27. Pp 1277-1284.

Poudel R. P, Kataoka I, Mochioka R. 2008. Effect of red and blue lightemitting diodes on growth and morphogenesis of grapes. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 92. Pp 147-153.

Ramos-Castellá A, Iglesias-Andreu L. G, Bello-Bello J, Lee-Espinosa H. 2014. Improved propagation of vainilla (*Vainilla planifolia* Jacks. Ex Andrews) using a temporary immersion system. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*.

Ri G, Song-Quan W, Xuan-Chun P, So-Young P, Mei-Lan L. 2014. Micropropagation of *Cymbidium sinense* using continuos an temporary airlift bioreactor system. *Acta Physiol Plant* 36. Pp 117-124.

Rodriguez R, Cid Mariela, Pina Danilo, Gonzalez-Olmedo J. L, Desjardins Y. Growth and photosynthetic activity during acclimatization of sugarcane plantlets cultivated in temporary immersion bioreactors. 2003. *In vitro Cell Dev Biol-Plant* 39. Pp 657-662.

Rosales Maldonado Enrique, Rodríguez de Francisco, Luis Enrique, Alvarado Gómez Omar, y Cárdenas Cerda María Elizabeth. 2003. Diseño y construcción de un sistema de inmersión temporal. *Centro Agrícola*, año 30, N°1, 4 p.

Roels S, Escalona M, Cejas I, Noceda C, Rodriguez R, Canal M. J, Sandoval J, Debergh P. 2005. Optimization of plantain (*Musa AAB*) micropropagation by temporary immersion system. *Plant Cell Tissue an Organ Culture* 82. Pp 57-66.

Roels S, Noceda C, Escalona M, Sandoval J, Canal M. J, Rodríguez R, Debergh P. 2006. The effect of headspace renewal ina temporary immersion

bioreactor on plantain (*Musa AAB*) shoot proliferation and quality. *Plant Cell, Tissue Organ Culture* 84. Pp 155-163.

Salgado-Garciglia R. 2000. Un sistema de propagación masiva de *Laelia speciosa* (HBK) Schlechter (Orchidaceae), como alternativa para la conservación. *Revista de la CIC/UMSNH, México*. No.1. p 27-30.

Sankar-Thomas Y. D, Saare-Surminski K, Liberei. 2008. Plant regeneration via somatic embryogenesis of *Camptotheca acuminata* in temporary immersion system (TIS). *Plant Cell Tissue Organ Culture* 95: 163-173.

Santana-Buzzy N, López-Puc G, Canto-Flick Adriana, Barredo-Pool F, Balam-Uc E, Avilés-Viña S, Solís-Marroquín D, Lecona-Guzmán C, Bello-Bello, J. J, Gómez-Uc E y Mijangos-Cortés J. O. 2009. Ontogenesis of the Somatic Embryogenesis of Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *HortScience* 44(1). Pp 113-118.

Shin S. K, Murthy N. H, Heo W. J, Hahn J. E, Paek Y. K. 2008. The effect of light quality on the growth and development of in vitro cultures *Doritaenopsis* plants. *Acta Physiol Plantae* 30. Pp 339-343.

Solís-Marroquín D, Lecona-Guzmán C. A, Canto-Flick A, Bello-Bello J. J, y Santana-Buzzy N. 2011. In Vitro Selection of a Salt-tolerant Embryogenic Line in Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *HoertScience* 46 (12). Pp 1666-1671.

Soto-arenas, M. A. y Solano-Gómez, A. R. 2007. Ficha técnica de *Laelia speciosa*. En: Soto-Arenas, M. A. (compilador). Información actualizada sobre las especies de orquídeas del PROY-NOM-059-ECOL-2000. Instituto Chinoín A.C., Herbario de la Asociación Mexicana de Orquideología A.C. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto No. W029. México, D.F.

Teisson C y Alvard D. 1999. In vitro production of potato microtubers in liquid 86rquíd using temporary immersion. Potato Research 42. Pp 499-504.

Tirado J. M, Naranjo E. J, Atehortúa L. 2005. Propagación in vitro de *Phalaenopsis* (Orchidaceae) a partir de protocormos, mediante el sistema de inmersión "RITA". Revista Colombiana de Biotecnología Vol. 11. Pp 25-31.

Tiza A. G. 2010. Propagación in vitro de las 86rquídeas *Dendrobium*, *Laelia anceps*, *Phalaenopsis* y *Sobralia xantholeuca*. Tesis de licenciatura en Químico Agrícola. Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Químicas Orizaba. Pp. 11-74.

Vázquez Cisneros Isaac. 2014. Tesis: Producción de embriones somáticos de *Brusera linanoe* (La Llave) Rzed., Calderón & Medina, en biorreactores de sistema de inmersión temporal. Colegio de Posgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México. Pp. 1-94.

Venkatachalam L, Bhagyalakshmi N. 2008. Spermine-induced morphogenesis and effect of partial immersion system on the shoot cultures of banana. Appl Biochem Biotechnol 151. Pp 502-511.

Watt M. P. 2012. Review. The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. African Journal of Biotechnology Vol. 11). Pp 14025-14035.

Welander M, Persson J, Asp H, Zhu L.H. 2014. Evaluation of new vessel system based on temporary immersion system for micropropagation. Journal Scientia Horticulturae 179, 227-232.

Wu R. Z, Chakrabaarty D, Hahn E. J, Peak K. Y. 2007. Micropropagation of an endangered jewel orchid (*Anaectochilus formosanus*) using bioreactor system. Horticultural Enviromental Biotechnology 48. Pp 376-380.

Yan H, Yang L, Li Y (2011). Improved growth and quality of *Discorea fordii* Prain et Burk and *Discorea alata* plantlets using a temporary immersion system. Afr. J. Biotechnol. 10:19444-19448

Young P. S, Murthy H. N, Yoeup K. 2000. Mass multiplication of protocorm-like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 63. Pp 67-72.

Zhu L-H, Li X-Y, Welander M. 2005. Optimisation of growing conditions for the apple rootstock M26 grown in RITA containers using temporary immersion principle. Plant Cell Tissue Organ Culture 81. Pp 313-318.

ANEXOS

Anexo 1. Análisis económico del BioEdUACH con *Laelia speciosa* K.S., proyectado a 5 años.

Cuadro 1. Inversiones, reinversiones y valor de rescate (\$).

	CONCEPTOS	INVERSIONES	VIDA TECNICA	VIDA ECONÓMICA	DEPRECIACIÓN ANUAL		VALOR RES.	VALOR REP.	PRESUPUESTO DE REINVERSIONES, PERIODOS					ULT ADQ.	PER. DE USO	RESCATE
					VALOR	%			1	2	3	4	5			
A	ACTIVOS FIJOS	35972			5864											
	Biorreactor (Prototipo)	22.315	7	5	3188	14	6376	15939						1	5	6376
	Filtros milipor 0.2µm (40 und)	1600	3	2	533	33	533	1067			1067		1067	5	1	1067
	Fitting autoclaveable de doble O-ring (80 und)	3200	3	2	1067	33	1067	2133			2133		2133	5	1	2133
	Tiras Led's	858	6	5	143	17	143	715						1	5	143
	Autoclave	8000	20	15	400	5	2000	6000						1	5	6000
	Acondicionamiento de laboratorio	8000	15	12	533	7	1600	6400						1	5	5333
B	ACTIVOS DIFERIDOS				1000											
	Gastos de instalación	5000			1000											
C	TOTAL	48972			6864						3200		3200			21052

Cuadro 2. Presupuesto de costos de operación (\$).

CONCEPTOS	Costo unitario	Cantidad	Costo total	CAPACIDAD (%)				
				1	2	3	4	5
				40%	60%	80%	100%	100%
COSTOS VARIABLES DE OPERACIÓN			8712	8712	13068	21602	21779	21779
Explante	1,4	800	1120	1120,0	1680	3360	2800	2800
Manguera de plástico de ¼" (m)	2,5	40	100	100,0	150	300	250	250
Frasco de plástico de 0,5L	10	80	800	800,0	1200	2400	2000	2000
Energía (mes)	330	12	3959	3958,8	5938	7918	9897	9897
Lampara fluorescente	110,51	2	221,02	221,0	332	663	553	553
Lampara Led luz calida	542,24	3	1627	1626,7	2440	4880	4067	4067
Lampara germicida	110,51	1	110,51	110,5	166	332	276	276
Filtros de 5µm	100	1	100	100,0	150	300	250	250
Filtros de 0,01µm	100	1	100	100,0	150	300	250	250
Reactivos (L)	71,8	8	575	575	862	1149	1437	1437
COSTOS FIJOS			96000	96000	96000	96000	96000	96000
Tecnico especializado (mes)	5.000	12	60000	60000	60000	60000	60000	60000
Ayudante en general (mes)	3.000	12	36000	36000	36000	36000	36000	36000
COSTOS TOTALES DE OPERACIÓN				104712	109068	117602	117779	117779

Cuadro 3. Consumo de energía eléctrica en KW/mes y costo \$.

Concepto	hr/dia	Wattios	Cantidad	Consumo (KW/mes)	Consumo (KW/mes)			
					2	3	4	5
Lampara fluorescente	24	28	4	80,64	120,96	161	202	201,6
Lampara Led luz calida	24	2,5	6	10,8	16,2	22	27	27
Tira de Led's	8	45	1	10,8	16,2	22	27	27
Lampara germicida	0,4	15	2	0,36	0,54	1	0,9	0,9
Control luces Led's	8	140	1	33,6	33,6	34	33,6	33,6
Regulador AC-CC	8	20	1	4,8	4,8	5	4,8	4,8
Compresor	1	1500	1	45	45	45	45	45
Temporizador	24	14	1	10,08	10,08	10	10,08	10,08
Electrovalvula	0,5	4,5	1	0,068	0,068	0	0,068	0,068
Relevador	0,16	60	3	0,864	0,864	1	0,864	0,864
Autoclave	1	1000	1	30	30	30	30	30
CONSUMO TOTAL				227	278	330	381	381
COSTO \$				330	470	609	749	749

Cuadro 4. Descripción de costos por consumo de energía.

Concepto	KW	Costo	Subtotal
Básico	100	1	69
Intermedio	50	1	52
Excedente	77	3	210
TOTAL			330

Cuadro 5. Costo de reactivos por ciclo de multiplicación para 40%.

Concepto	L	\$	Cantidad	\$/L
MS en L	0,01	686,4	10	0,6864
BAP (mg/L) en Kg	0,0005	5830	1	2,915
SOLUCION F (200ml)	gr	\$	gr	\$/L
Glicina	0,04	671	500	0,05368
Mio-inositol	2	1700	50	68
Ácido nicotínico	0,01	3.367	25	1,3468
Piridoxina HCL	0,01	3.367	25	1,3468
Tiamina HCL	0,002	4283	250	0,034264
Concepto	Kg/L	\$	Kg	\$/L
sacarosa	0,03	12	1	0,36
TOTAL				71,83

Cuadro 6. Programa de producción y venta de *Laelia speciosa* K.S. después de la etapa de multiplicación.

Producto	Precio unitario \$	Cantidad	Total \$	1	2	3	4	5
				40%	60%	80%	100%	100%
Explante <i>Laelia speciosa</i> K.S..	5	16000	80000	80000	120000	160000	200000	200000

Cuadro 7. Presupuesto de capital incremental de trabajo* (\$)

CONCEPTOS	CAPACIDAD (%)				
	40	60	80	100	100
	1 año	2 año	3 año	4 año	5 año
COSTOS DE OPERACIÓN	104712	109068	117602	117779	117779
CAPITAL DE TRABAJO	94241	98161	105841	106001	106001
CAPITAL INCREMENTAL DE TRABAJO	94241	3920	7681	160	0

Capital de trabajo= 90% de los costos de operación

Cuadro 8. Estado de resultados (\$).

CONCEPTOS	PERÍODO DE ANÁLISIS DEL PROYECTO				
	40	60	80	100	100
	1	2	3	4	5
INGRESOS TOTALES	80000	120000	160000	200000	200000
EGRESOS TOTALES	111576	115932	124466	124643	124643
Costos de operación	104712	109068	117602	117779	117779
Costos variables	8712	13068	21602	21779	21779
Costos fijos	96000	96000	96000	96000	96000
DEPRECIACION DE ACTIVOS FIJOS	5864	5.864	5.864	5.864	5.864
AMORTIZACION DE ACTIVOS DIF DIFERIDOS	1000	1000	1000	1000	1000
UTILIDAD BRUTA	-31576	4068	35534	75357	75357
I. S. R. (280%)	0	0	0	0	0
P. T. U. (10%)	0	0	0	0	0
UTILIDAD NETA DISPONIBLE	-31576	4068	35534	75357	75357
DIVIDENDOS	0	1	2	3	4
UTILIDADES NO DISTRIBUIDAS	-31576	4067	35532	75354	75353
PUNTO DE EQUILIBRIO (%)	1,35	0,90	0,69	0,54	0,54

Cuadro 9. Flujo de fondos.

CONCEPTOS		CAPACIDAD (%)				
		40	60	80	100	100
		1	2	3	4	5
COSTOS CON EL PROYECTO		247.925	112.988	128.482	117.939	120.979
Inversiones		48.972				
Reinversiones		0	0	3.200	0	3.200
Costos de operación		104.712	109.068	117.602	117.779	117.779
Capital incremental de trabajo		94.241	3.920	7.681	160	0
I. S. R.		0	0	0	0	0
PTU.		0	0	0	0	0
BENEFICIOS CON EL PROYECTO		80.000	120.000	160.000	200.000	327.053
Ingresos totales		80.000	120.000	160.000	200.000	200.000
Recuperación del capital de trabajo						106.001
Valor de rescate						21.052
Subsidios						
FLUJO DE FONDOS		-167.925	7.012	31.518	82.061	206.074
INVERSIÓN INICIAL DEL PROYECTO						
TASA DE ACTUALIZACIÓN = 15%						
VALOR ACTUAL NETO: VAN (15%)	\$29,377.95					
TASA INTERNA DE RETORNO: TIR	21.39%					
RELACION BENEFICIO/COSTO: B/C	\$1.06					
VALOR ACTUAL DE LOS BENEFICIOS	\$542,459					
VALOR ACTUAL DE LOS COSTOS	\$513,081					