Rev. Agricultura Tropical Vol. 9, No. 1:27-35, enero-junio, 2023
ISSN on line: 2517-9292, RNPS: 2397

DETERMINACIÓN DEL TIEMPO Y FRECUENCIA DE INMERSIÓN EN EL CULTIVAR DE PLÁTANO BURRO 'INIVIT PB-2012' EN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL

Milagros Basail Pérez*, Víctor Medero Vega, Jorge López Torres, Aymé Rayas Cabrera, Arletys Santos Pino, Sadi Trujillo Machado, Yoel Beovides García.
Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales, (INIVIT), Apartado 6, CP: 53 000, Santo Domingo, Villa Clara, Cuba.
**Autora para la correspondencia: sit.biotec@inivit.cu*

Recibido: 25 de abril de 2023; Aceptado: 17 de mayo de 2023

RESUMEN
El trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT) con el objetivo de incrementar el número de explantes en el cultivar de plátano burro 'INIVIT PB-2012', de alta demanda por los productores, en el Sistema de Inmersión Temporal (SIT). Se estudiaron diferentes tiempos de inmersión (5, 10 y 15 minutos) y frecuencias de inmersión (3, 6 y 8 horas) en frascos plásticos de cuatro litros de volumen total. Se evaluó el coeficiente de multiplicación (u), diámetro del pseudotallo (cm), grado de oxidación (u) y altura del explante (cm). A partir de los resultados obtenidos se logró aumentar el coeficiente de multiplicación de 1:4,82 a 1:8,75 en el Sistema de Inmersión Temporal con un tiempo de inmersión de 10 minutos y una frecuencia cada 3 horas, es decir, 8 inmersiones al día y un tiempo de cultivo de 18 días permitiendo alcanzar la mayor productividad del material en fase de multiplicación sin síntomas de hiperhidricidad.
Palabras clave: coeficiente de multiplicación, explantes, micropropagación, sistema de inmersión temporal

DETERMINATION OF THE TIME AND FREQUENCY OF IMMERSION IN THE DONKEY PLANTAIN CULTIVAR 'INIVIT PB-2012' IN A TEMPORARY IMMERSION SYSTEM

ABSTRACT
The work was developed in the Plant Biotechnology Laboratory of the Tropical Viand Research Institute (INIVIT) with the objective of increasing the number of explants in the donkey plantain cultivar 'INIVIT PB-2012', in high demand by producers, in the Temporary Immersion System (SIT). Different immersion times (5, 10 and 15 minutes) and immersion frequencies (3, 6 and 8 hours) were studied in plastic bottles with a total volume of four liters. The multiplication coefficient (u), diameter of the pseudostem (cm), degree of oxidation (u) and height of the explant (cm) were evaluated. From the results obtained, it was possible to increase the multiplication coefficient from 1: 4.82 to 1: 8.75 in the Temporary Immersion System with an immersion time of 10 minutes and a frequency every 3 hours, that is, 8 immersions per day and a cultivation time of 18 days allowing the greatest productivity of the material in the multiplication phase to be achieved without symptoms of hyperhydricity.

Keywords: multiplication coefficient, explants, micropropagation, temporary immersion system.

INTRODUCCIÓN

Los plátanos y bananos (*Musa* spp.) son una fuente importante de alimentos para gran parte de la población mundial, localizada principalmente en países tropicales. La producción anual de plátanos de 124,56 MMt, (FAO, 2022).

Las técnicas comerciales de micropropagación de plátanos y bananos hacen parte de la modernización de la agricultura en muchos países y han contribuido a mejorar las condiciones sanitarias de las plantaciones e incrementar su productividad. Los primeros trabajos sobre la obtención de plantas de plátano mediante las técnicas de organogénesis se informaron en 1972 (Ma y Shii, 1972); a partir de estos se han cultivado gran número de variedades y cultivares *in vitro* del género *Musa* spp.

Dentro de las técnicas de cultivo de tejidos, la micropropagación es una alternativa desarrollada para la producción a gran escala de plantas, que ha sido utilizada con éxito desde los años 60 del siglo pasado. La principal ventaja de esta técnica estriba en la multiplicación rápida del material clonal libre de enfermedades, fisiológicamente uniforme y con un desarrollo normal. Estas características han servido para introducir rápidamente en el mercado nuevas variedades de plantas obtenidas mediante la selección, mutación, programas de mejora y manipulación genética (Cañal, 1999). En general la micropropagación de plantas presenta algunas desventajas como son: bajos coeficientes de multiplicación, alto costo por mano de obra y la escasa posibilidad de automatización que brinda el proceso (Kitto, 1997).

En los últimos tiempos se han desarrollado investigaciones sobre la automatización en la propagación de plantas, que incluyen el diseño de nuevos sistemas para la micropropagación, ya que reducen el costo por explantes, permiten una mayor optimización biológica por los altos coeficientes de multiplicación que se obtienen y un mejor comportamiento de las vitroplantas *ex vitro* por mayor metabolismo autotrófico durante la fase *in vitro* (Georgiev *et al*., 2014).

Los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) son una de las herramientas más avanzadas para la micropropagación comercial. Se basan en el principio operativo de simplemente sumergir las células, tejidos u órganos en medios líquidos durante períodos de tiempo (Biochemie, 2018; Wu*et et al*., 2018; Georgiev *et al*., 2014); además promueve procesos fisiológicos como la fotosíntesis, la respiración, el desarrollo de la clorofila y el funcionamiento estomático, lo que favorece el desarrollo durante el proceso de aclimatación (Aragón *et al*., 2014).

Teniendo en cuenta lo anterior el presente trabajo se realizó con el objetivo de incrementar el número de explantes del cultivar de plátano burro 'INIVIT PB-2012' de alta demanda por los productores en el Sistema de Inmersión Temporal.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT).

Procedimientos generales

Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 121^{o}C de temperatura y 1,2 Kg.cm^{-2} de presión, el tiempo de esterilización varió en dependencia del volumen de medio de cultivo a esterilizar, según información técnica de SIGMA (1991). El

instrumental utilizado más placas de Petri (80x15 mm) para el manejo de los explantes fue esterilizado en estufa a 180^{o}C durante 2 horas.
El pH de los medios de cultivo fue ajustado antes de la esterilización con NaOH 1,0 N ó HCL 1,0 N. El manejo de los explantes se realizó en condiciones de esterilidad en una cámara de flujo laminar horizontal.

Medios de cultivo
Para la preparación de los medios de cultivo se emplearon las sales propuestas por Murashige y Skoog (1962) MS. La composición específica de los diferentes medios de cultivo se define en cada acápite según el tema objeto de estudio.
Para la etapa de multiplicación de los explantes se utilizó como agente gelificante el agar-agar a razón de 6,0 g.L^{-1}. En los frascos de cultivo de cuatro litros de volumen total se dosificó un volumen de 2000 ml de medio de cultivo por Sistema de Inmersión temporal.
***Condiciones de cultivo* in vitro**
Luz artificial: se utilizó un fotoperiodo de 16 horas de luz y ocho de oscuridad, y una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) de 62-68 µmol m^{-2} s^{-1}, temperatura 27±2°C.
Componentes del sistema de inmersión temporal
Se emplearon baterías de frascos de cultivo formados por dos frascos de cuatro litros de volumen total, uno para el crecimiento de los explantes y el otro como reservorio de medio de cultivo. Estos frascos fueron conectados entre sí por una manguera de silicona de 6 mm de diámetro mediante conectores que atraviesan la tapa. En la parte interna de la misma se colocó una manguera menos flexible, la cual desciende hasta el fondo en ambos recipientes. El medio de cultivo circuló de un frasco a otro en dependencia de la apertura o cierre de las electroválvulas, las cuales estaban conectadas a un temporizador programable para la determinación de la frecuencia y la duración de la inmersión. A la entrada de los frascos se colocaron filtros hidrofóbicos (0,22 µm, Midisart 2000, Sartorius AG) para garantizar la esterilidad y la presión de aire, está fue regulada por un manómetro. Además, posee un compresor de aire con encendido automático que garantizó la disponibilidad del mismo (Escalona, 1999).
Material vegetal
Se utilizó el cultivar de plátano burro 'INIVIT PB-2012'. A partir de plantas en floración, previamente seleccionadas con buen estado fitosanitario y nutricional, se seleccionaron los hijos de tipo "espada" con una altura entre 25 y 30 cm, los cuales fueron llevados a condiciones semicontroladas (Fase 0 de la micropropagación) en una casa de cultivo cubierta por una malla plástica de color verde (zarán), que logra una reducción de la intensidad luminosa del 70%. El riego se realizó por microaspersión mediante el sistema microjet con una frecuencia de seis riegos al día y una duración de dos minutos cada uno, lo cual garantizó una humedad relativa del 85-90%. Transcurridos 45 días se eliminaron las partes más externas del cormo y las vainas foliares, hasta obtener secciones de aproximadamente 10 cm de largo y cinco centímetros de diámetro, que encierran el ápice vegetativo.
Determinación del tiempo de inmersión en el Sistema de Inmersión Temporal.
Se utilizaron dos frascos plásticos de cuatro litros de volumen total. Se empleó el medio de multiplicación formado por las sales y vitaminas MS suplementado con 2,25 mg.L^{-1} de 6-BAP; 0,18 mg.L^{-1} de AIA; 30,0 g.L^{-1} de sacarosa; 10,0 mg.L^{-1} de ácido ascórbico, según López *et al*. (2009).

Se definieron tres tratamientos.

I. Tiempo de inmersión por 5 minutos(control)
II. Tiempo de inmersión por 10 minutos
III. Tiempo de inmersión por 15 minutos

La frecuencia de inmersión fue de 3 inmersiones por día.

Efecto de la frecuencia de inmersión

Se utilizaron las mismas condiciones experimentales del experimento anterior, así como el medio de cultivo. Se empleó la mejor variante del experimento tiempo de inmersión y se varió la frecuencia de inmersión. Los tratamientos utilizados fueron:

I. Frecuencia de inmersión cada 3 horas
II. Frecuencia de inmersión cada 6 horas
III. Frecuencia de inmersión cada 8 horas (control)

Para la realización del subcultivo de los explantes primeramente se desinfectó la superficie del frasco que contenía el material con alcohol al 70% en la cámara de flujo laminar. Se abrió el frasco y se comenzó a extraer por partes el material que contenía el mismo, se fueron colocando en placas de Petri (80x15 mm) y posteriormente se subcultivaron por grupos y se colocaron 10 explantes en tarrinas de 500 ml de volumen total.

Las evaluaciones se realizaron a los 18 días de cultivo y se emplearon 50 explantes por frasco de cultivo y tres repeticiones por tratamiento donde se evaluó:

- Coeficiente de multiplicación (unidades). Se determinó por el número de brotes finales con respecto al número de brotes iniciales.
- Altura de los brotes de yemas axilares (cm). Se midió desde la base del pseudotallo hasta la inserción de la primera hoja.
- Grado de oxidación según escala de Novak *et al*. (1994)
  Grado 0: no hubo oxidación, coloración del explante de blanco - amarillo crema.
  Grado 1: Incipiente coloración carmelita sin llegar a la necrosis del tejido.
  Grado 2: 25% de tejido necrótico en la base del explante.
  Grado 3: 50% de tejido necrótico en la base del explante.
  Grado 4: 75% de tejido necrótico en la base del explante con penetración.
  Grado 5: 100% de tejido necrótico en la base del explante con penetración y se necesitan cortes profundos para lograr que la asimilación de nutrientes sea efectiva.
- Diámetro del pseudotallo de los brotes de yemas axilares (cm). Se midió el diámetro de la base del pseudotallo.

Procesamiento estadístico

Con los criterios de estadística descriptiva se realizaron las tablas que expresan los resultados procesados con estadística inferencial paramétrica (análisis de varianza de clasificación simple). La comparación múltiple de medias se realizó según Tukey cuando se encontró homogeneidad de varianza, (Lerch, 1977). Se utilizó el paquete estadístico MSTAT-C de la Universidad de Micchigan (Bricker, 1993, citado por Guzmán y Castaño, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del tiempo de inmersión

El tiempo de inmersión en el Sistema de Inmersión Temporal influyó de forma significativa. Con un tiempo de inmersión de 10 minutos y una inmersión cada 8 horas

(tres inmersiones por día) se alcanzaron los mejores resultados para las variables evaluadas, con diferencias significativas respecto al resto de los tratamientos (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto del tiempo de inmersión en el cultivar de plátano 'INIVIT PB-2012' en Sistema de Inmersión Temporal.

Tratamientos	Coeficiente de Multiplicación	Diámetro del pseudotallo (cm)	Grado de oxidación	Altura (cm)
5 minutos	4,82 c	0,32 c	3,25 c	1,28 c
10 minutos	6,77 a	0,61 a	2,98 a	2,85 a
15 minutos	5,46 b	0,47 b	2,17 b	1,99 b
EE ±	0,26*	0,11 *	0,15 *	0,09 *
CV (%)	9,98	11,26	12,89	11,65

Letras desiguales dentro de cada columna difieren para $p<0,05$ según prueba de Tukey.

En el cultivo de la Vainilla (*Vanilla planifolia* (A.), Villega y Palma (2022) lograron incrementar el coeficiente de multiplicación de 20,0 a 36,0 al utilizar un tiempo de inmersión de 15 minutos con una frecuencia cada 6 horas y 40 ml de medio de cultivo por explante con el empleo de Biorreactores de Inmersión Temporal.
Pérez *et al*. (2020) en el cultivar de *Morus alba* (L.) variedad criolla, al utilizar un tiempo de inmersión de 3 minutos con una frecuencia cada 8 horas logró aumentar el número de brotes de 1,9 (método convencional) a 4,67 (Sistema de Inmersión Temporal) con diferencias significativas con el resto de los demás tratamientos.
Ramírez-Mosqueda *et al*. (2016) utilizaron "cluster" en el cultivar de Vainilla (*Vanilla planifolia* (A.) provenientes de yemas axilares al igual que Spinoso (2017) donde iniciaron la micropropagación en Sistemas de Inmersión Temporal por medio de segmentos nodales y como resultados obtuvieron que el tiempo de inmersión utilizado en estos sistemas varía de manera importante según la especie y del tipo de SIT que se selecciona para la micropropagación de plantas.
Rosales *et al*. (2018) durante la propagación *in vitro* de la Estevia (*Stevia rebaudiana* (B.) obtuvieron coeficientes de multiplicación de 13,50 al utilizar una frecuencia de inmersión cada 12 horas (2 inmersiones al día) y 3 minutos de inmersión).

Efecto de la frecuencia de inmersión

Cuando se utilizó la frecuencia de inmersión cada 3 horas, con un tiempo de 10 minutos se obtuvieron los mejores resultados para las variables evaluadas, con diferencias significativas respecto al resto de los tratamientos sin la presencia de brotes hiperhidratados, ni multiyemas (Tabla 2).
Estos resultados coinciden con los obtenidos por (Ahmadian*et al*., 2017) y (Uma *et al*., 2021) donde las frecuencias cortas aumentan el coeficiente de multiplicación.
Rico *et al*. (2022) utilizaron diferentes Sistemas de Inmersión Temporal en el cultivar de *Cannabis sativa* (L.) y como resultado obtuvieron coeficientes de multiplicación de 8 por cada explante adicionado al sistema RITA® y en el Plantform de 24,0; muy superior al sistema anterior con un tiempo de inmersión de 1 minuto con una frecuencia cada 8 horas (3 inmersiones por día).

Tabla 2. Efecto de la frecuencia de inmersión en los brotes axilares en el cultivar de plátano 'INIVIT PB-2012' en Sistema de Inmersión Temporal.

Tratamientos	Coeficiente de Multiplicación	Diámetro del pseudotallo (cm)	Grado de oxidación	Altura (cm)
3 horas	8,75 a	0,67 a	2,25 b	3,75 a
6 horas	5,26 c	0,28 c	3,98 a	3,29 b
8 horas	4,21 b	0,45 b	3,56 a	2,99 c
EE ±	0,32*	0,12 *	0,14 *	0,10 *
CV (%)	9,38	14,26	11,25	12,56

Letras desiguales dentro de cada columna difieren para p<0,05 según prueba de Tukey.

Contreras *et al*. (2022) en Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) lograron incrementar el coeficiente de multiplicación en brotes de alcaparro (*Capparis spinosa* (L.) de 38,5 por el método de propagación convencional, semisólido a 89,0 con el empleo del SIT con un tiempo de inmersión de 2 minutos y una frecuencia cada 6 horas.

Martínez *et al*. (2019) al utilizar una frecuencia de inmersión temporal cada 12 horas y 50 ml por explante en el cultivar del Anturium (*Anthurium andreanum* (L.) lograron obtener un coeficiente de multiplicación de 33,12 explantes en Biorreactores.

Villegas y Palma (2019) en el cultivo del jengibre (*Zingiber officinale* (R.) al utilizar un tiempo de inmersión de cinco minutos, una frecuencia de inmersión cada seis horas y un volumen de medio de cultivo de 40 ml por explante en el Sistema de Inmersión Temporal obtuvieron un coeficiente de multiplicación de 4,4 lo que superó la respuesta obtenida de brotes de jengibre cultivados en medio de cultivo semisólido (2,9).

Doina *et al*. (2019) en el cultivo del arándano (*Vaccinium corymbosum* (L.) con un tiempo de inmersión de un minuto y una frecuencia cada una hora y aireación una vez por hora con una duración de 4 minutos cada una, obtuvieron una tasa de proliferación más alta (6,20) en el biorreactor que contenía 500 ml de medio de cultivo, mientras que los brotes más largos (4,19) se registraron en el biorreactor con 400 ml del medio de cultivo.

Alamilla *et al*. (2019) obtuvieron coeficiente de multiplicación de 26,4 por explantes al utilizar el Sistema de Inmersión Temporal tipo RITA® durante la propagación *in vitro* del Anturium (*Anthurium andreanum* (L.) con un volumen de medio de cultivo de 20 ml por explante.

Minchala *et al*. (2021) durante la propagación *in vitro* de la palma (*Carludovica palmata* (R.) con un tiempo de inmersión de cinco minutos, una frecuencia cada seis horas y 100 ml por explante de medio de cultivo lograron obtener coeficientes de multiplicación de 10,60; pero cuando utilizaron volúmenes de medio de cultivo de 200 ml por explante obtuvieron 11,32 brotes por cada explante adicionado al Sistema de Inmersión Temporal.

Según Bello *et al*. (2019) en el cultivo del banano (Grand Naine) alcanzaron un coeficiente de multiplicación a 7,3; incluso superior a los resultados informados por Roels *et al*. (2006) y Wilken *et al*. (2014) quienes trabajaron con los sistemas SETIS™ en el cultivar de plátano CEMSA ¾ (AAB) y el cultivar de banano Grand Naine.

Mendoza *et al*. (2022) en el cultivo del maguey tepeztate (*Agave marmorata* (R.) utilizando un nuevo Sistema de Inmersión Temporal (Green Tray®) lograron incrementar el coeficiente de multiplicación de 2,33 por el método de propagación convencional,

semisólido a 5,69 con estos Biorreactores al utilizar un tiempo de inmersión de un minuto con una frecuencia de inmersión cada seis horas.
Mancilla *et al*. (2021) al utilizar Biorreactores SETIS™ en la propagación *in vitro* de malanga *Colocasia esculenta* (L.) lograron incrementar el coeficiente de multiplicación de 20 brotes por el método de propagación convencional a 36 con el empleo de estos nuevos sistemas.
Regueira *et al*. (2018) obtuvieron altos coeficientes de multiplicación sumergiendo los brotes de mimbrera blanca (*Salix viminalis* (P.) durante un tiempo de inmersión de un minuto con una frecuencia de inmersión de 3 o 6 veces al día, con aireación adicional de un minuto por hora en los biorreactores Plantform™.
Los experimentos desarrollados permitieron incrementar el coeficiente de multiplicación en el cultivar de plátano burro 'INIVIT PB-2012' en Sistema de Inmersión Temporal de 1: 4,82 a 1: 8,75 obteniendo plantas con características muy superiores a las obtenidas en medios de cultivo en estado semisólido (Figura 1).



Figura 1. Plantas *in vitro* del cultivar de plátano 'INIVIT PB-2012' multiplicadas en el Sistema de Inmersión Temporal.

La superioridad del nuevo método entre otros aspectos está dada por el empleo del medio de cultivo en estado líquido, que, a diferencia del medio de cultivo en estado semisólido, facilita la asimilación de los nutrientes por los explantes. Además, en estos sistemas los explantes no están constantemente en contacto con el medio de cultivo, sino, sólo a determinada frecuencia y un período corto de tiempo que permite la renovación constante de la atmósfera interna de los frascos y evita la acumulación de gases nocivos como el etileno, así como, facilita la regulación de la concentración de CO_2 y mejora la oxigenación de los tejidos. Castro *et al*. (2001) demostraron que los explantes retienen una película del medio de cultivo que evita la desecación e incrementa la disponibilidad y asimilación de los nutrientes, lo cual se traduce en un crecimiento más vigoroso y mejor desarrollo. Además, estos aspectos positivos del SIT, favorecen un incremento en la fotosíntesis de las plantas.

CONCLUSIONES

1. Se logró la multiplicación del cultivar de plátano burro 'INIVIT PB-2012' en el Sistema de Inmersión Temporal con un tiempo de inmersión de 10 minutos; además se disminuyó la frecuencia de inmersión de los explantes de ocho horas a tres horas (ocho inmersiones por día), permitiendo de esta forma incrementar el coeficiente de multiplicación de 1:4,82 a 1: 8,87.

BIBLIOGRAFÍAS

AHMADIAN, M.; A. BABAEI; S. SHOKRI; S. HESSAMI. 2017. Micropropagation of carnation (*Dianthus caryophyllus* (L.) in liquid medium by temporary immersion bioreactor in comparison with solid culture. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(2):309-315. https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.07.005.

ALAMILLA, J.; J. CAAMAL; M. CRIOLLO; J. VERA; J. REYES. 2019. Biofábricas y biorreactores de inmersión temporal: Propagación *in vitro* de *Anthurium andreanum* (L.) y su viabilidad económica. *Agro Productividad* 12(10): 23-29.

ARAGÓN, C.; C. SÁNCHEZ; J. GONZALEZ; M, ESCALONA; L. CARVALHO; S. AMÂNCIO. 2014. Comparison of plantain plantlets propagated in temporary immersion bioreactors y gelled medium during *in vitro* growth y acclimatization. *Biol Plant* 58(1):29-38.

BELLO, J.; C. CRUZ; J. PÉREZ. 2019. A new temporary immersion system for commercial micropropagation of banana (*Musa* AAA cv. Grand Naine). *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. Springer. 55(3):313-320.

BIOCHEMIE B.V. 2018. SETIS™ Bioreactor Temporary immersion systems in plant micropropagation. Disponible en: https://goldbio.com/uploads/documents/e180bada1cb34c1d27fac8da859b8a93.pdf.

CAÑAL, M. J. 1999. Fisiología del cultivo *in vitro.* En: Biotecnología Vegetal: Libro de reportes cortos del 5to Coloquio Internacional de Biotecnología vegetal, IBP, Santa Clara, Cuba, pp. 14-22.

CONTRERAS, F.; L. CHÁVEZ; J. MORALES; E. PÉREZ. 2022. Micropropagación del Alcaparro en medio semisólido y en biorreactores de inmersión temporal. *Revista Méxicana de Ciencias Agrícolas*. 12(1): 12-25.

DOINA, M.; O. BORSAL; D. PAMFIL.2019. Micropropagation of *Vaccinium corymbosum* (L.) and corylus avellana (L.) Using a temporary immersion bioreactor system clapa. *Agriculture*. 3(4): 111-112.

ESCALONA, M. 1999. Tesis para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas, Universidad de Ciego de Ávila, Centro de Bioplantas de Ciego de Ávila, 94p.

FAO. 2022. FAOSTAT. FAO Statistics Division. http://faostat.fao.org/site/526/default.aspx.

GEORGIEV, V.; A. SCHUMANN; A. PAVLOV; T. BLEY. 2014. Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in Life Sciences*, 14(6): 607-621.

GUZMÁN, O.; Y. CASTAÑO. 2002. Reconocimiento de nematodos fitopatógenos en plátanos ´Dominico hartón´ (*Musa* AAB, Simmonds), ´Africa´, ´FHIA-20´ y ´FHIA-21´ en Colombia. Info*Musa*, 11 (2): 34-35.

KITTO, S.L. 1997. Commercial Micropropagation. *HorScience*, 32(6): 1012-1014.

LERCH, G.H. 1977. La experimentación en las Ciencias Biológicas y Agrícolas. Ed. Científica y Técnica. La Habana, 288p.

MA, S.; C. SHII.1972. *In vitro* formation of adventitious buds in banana shoot apex following decapitation. *Journal of the Chinese Society of Horticultural*, 18(1): 135-142.

MANCILLA-ÁLVAREZ, E.; J.A. PÉREZ-SATO; R. NÚÑEZ-PASTRANA; J.L. SPINOSO-CASTILLO; J.J. BELLO-BELLO. 2021. Comparison of different semi-automated Bioreactors for *in vitro* propagation of Taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott). *Plants,* 10(5):1005-1010. https://doi.org/10.3390/plants10051010.

MARTÍNEZ, E. ; B. ISLA; J. PÉREZ; J. BELLO. 2019. Temporary immersion improves *in vitro* multiplication and acclimatization of *Anthurium andreanum* (L.). *Scientia Horticulturae*, 249: 185-191. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.01.053.

MENDOZA, C.R.; R. DOLCET; M.L. ORELLANA; I. LÓPEZ; M.B. VARGAS; D.I. RIVERA 2022. Micropropagación de *Agave marmorata* utilizando un nuevo Sistema de Inmersión Temporal. *Revista Ciencia, Tecnología y Sociedad*, 2(1):10-16.

MINCHALA, N.; R. HOYOS; G. CORREA. 2021. Micropropagation of iraca palm (*Carludovica palmata* (Ruiz y Pav) using a temporary immersion system. *Research square*, *preprint*. https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2156412/v1.

MURASHIGE, T. and F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.

NOVAK, F.; R. AFZA; M. DUREN. 1994. Fiel evaluation of tissue-culture bananas in grade oxidation. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 30: 569-574.

PÉREZ, J.L.; M. FONSECA; M. BAHI; J. SILVA; S. WERBROUCK. 2020. Multiplicación *in vitro* de *Morus alba* (L.) variedad criolla en sistemas de inmersión temporal. *Pastos y Forrajes* [online], 43(3): 235-243.

REGUEIRA, M.; E. RIAL; B. BLANCO; B. BOGO; A. ALDREY; B. CORREA; E. VARAS; C. SÁNCHEZ; N. VIDAL. 2018. Micropropagation of axillary shoots of *Salix viminalis* using a temporary immersion system. *Trees*, 32(1): 61-71. https://doi.org/10.1007/s00468-017-1611-x.

RICO, S.; J. GARRIDO; C. SÁNCHEZ; C. FERREIRO; V. CODESIDO; V. VIDAL. 2022. A temporary inmersion system to improve *Cannabis sativa* (L.) microprogation. *Front. Plant Sci.,* 13:895971. doi: 10.3389/fpls.2022.895971.

ROSALES, C.; J. BRENES; K. SALAS; S. ARCE; A. Esquivel. 2018. Micropropagation of *Stevia rebaudiana* (B.) in temporary immersion systems as an alternative horticultural production method. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 24(1): 69-84. https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2017.08.028.

UMA, S.; R. KARTHIC; S. KALPANA; B. SUTHANTHIRAM; M. SARASWATHI. 2021. A novel temporary immersion bioreactor system for large scale multiplication of banana (Rasthali AAB—Silk). *Scientific Reports*, 11, 20371. DOI: 10.1038/s41598-021-99923-4.

VILLEGAS-RAMÍREZ, J.; T. PALMA-ZÚÑIGA. 2019. Multiplicación *in vitro* de *Zingiber officinale (*R.) cv. 'Gran Caimán' en sistema de inmersión temporal. *Biotecnología Vegetal* 19(4): 12-22.

VILLEGAS-RAMÍREZ, J.; T. PALMA-ZÚÑIGA. 2022. Caracterización morfogénica de la Vainilla (*Vanilla planifolia*, (A.) para su propagación. *Agronomía Costarricense*, 46(1): 9-24.

WU, H.; M. KUO; C. CHEN. 2018. Promotion of vegetative growth in force-ventilated *Protea cynaroides* (L.) explants cultured in modified temporary immersion culture vessels. *HortScience*, 53:231-235.