

EMPLEO DE LOS SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL (SIT) EN EL CULTIVO *IN VITRO* DE PLANTAS

Edel Alejandro Toledo Rodríguez*, Aydiloide Bernal Villegas, Rafael Gómez Kosky.
Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar (ETICA) Centro-Villa Clara, INICA, Cuba.
ETICA Centro-Villa Clara, Apartado 20, Ranchuelo, CP: 53 100, Villa Clara, Cuba.
*Autor para la correspondencia: edel.toledo@inicavc.azcuba.cu

Recibido: 3 de noviembre de 2021; Aceptado: 22 de diciembre de 2021

RESUMEN

El desarrollo de Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) para el cultivo *in vitro*, a fines de la década de 1990, anunció nuevos métodos semiautomáticos de micropropagación de plantas con fines agrícolas y de conservación. Para 2005, se habían desarrollado y probado varios sistemas y sus beneficios fueron usados con una variedad de cultivos de importancia comercial como la caña de azúcar, el café, el banano y el ñame. El empleo SIT ha demostrado ser una variante más eficiente de la micropropagación vía organogénesis sin comprometer la estabilidad genética del material vegetal. Se ha revisado el progreso en el campo y la adopción de estos sistemas en años anteriores. Se informan mejoras en los protocolos de SIT desarrollados anteriormente para especies económicamente importantes, y esto continúa dando fe de sus beneficios en comparación con los protocolos que emplean medios de cultivo semisólidos o líquidos. Aunque recientemente se han desarrollado protocolos en SIT para otras especies de plantas, esta lista es limitada. Por otro lado, existe un interés cada vez mayor en esta tecnología para la producción de metabolitos secundarios y estudios fisiológicos.

Palabras claves: Biorreactor, cultivo *in vitro*, metabolitos secundarios, micropropagación

USE OF TEMPORARY IMMERSION SYSTEMS (SIT) IN THE *IN VITRO* CULTIVATION OF PLANTS

ABSTRACT

The development of temporary immersion systems (TIS) for *in vitro* culture, in the late 1990s heralded new and semi-automated means of micropropagation of plants for agricultural and conservation purposes. By 2005, various systems had been developed and tested and their benefits were proven with a variety of commercially-important crops such as sugar-cane, coffee, banana, and yam. The use of TIS has proven to be a more efficient variant of micropropagation via organogenesis without compromising the genetic stability of the plant material. Progress in the field and the adoption of these systems in subsequent years has been reviewed. Improvements on previously-developed TIS protocols for economically-important species have been reported, and this continues to attest to their benefits when compared with protocols that employ semi-solid or liquid media. Though TIS protocols have recently been developed for other species, this list is limited. On the other hand, there appears to be an increasingly great interest in TIS technology for the production of secondary metabolites and for physiological studies.

Keywords: Bioreactor, *in vitro* culture, secondary metabolites, micropropagation

INTRODUCCIÓN

Los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) tipo Biorreactores (BIT) se desarrollaron hace varias décadas por autores como Jiménez *et al.* (1999) y Escalona *et al.* (1999). Estos proporcionan un ambiente más natural para el cultivo *in vitro* de brotes y raíces. Además, brindan la posibilidad de controlar las propiedades químicas y físicas en el ambiente de los recipientes de cultivo (Watt, 2012).

Esta técnica permite incrementos significativos del coeficiente de multiplicación y la automatización (Alvard *et al.*, 1993). Varias investigaciones coinciden en la posibilidad de emplear para la micropropagación en diferentes especies de plantas: caña de azúcar (*Saccharum* spp.), piña (*Ananas Comosus* L.), plátano y banano (*Musa* spp.), papa (*Solanum tuberosum* L.).

Los SIT disminuyen los costos de producción por mano de obra, ahorran energía, incrementan la eficiencia productiva del proceso propagación *in vitro*. Requieren de menor espacio, lo cual propicia un aumento de las capacidades productivas de los laboratorios comerciales (Bernal *et al.*, 2002 y De Feria *et al.*, 2002).

Esta revisión podría ser útil para los científicos, investigadores y estudiantes que centra su trabajo en la manipulación *in vitro* y cultivos de órganos y tejidos vegetales. Además, se muestran ejemplos recientes de la aplicación de esta tecnología en la propagación *in vitro* de diferentes especies vegetales de importancia económica, la producción de metabolitos secundarios, proteínas recombinantes y la multiplicación y germinación de embriones somáticos.

El presente trabajo tuvo como objetivo actualizar sobre el estado del arte de los diferentes tipos de Sistemas de Inmersión Temporal, su clasificación y usos más frecuentes en los laboratorios de cultivo de tejidos vegetales.

REVISIÓN CRÍTICA DE LA LITERATURA

Sistemas de Inmersión Temporal (SIT)

Los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) son una técnica de contacto periódico e intermitente, donde los tejidos de las plantas son alternados por periodos de inmersión en medio de cultivo líquido y periodos en aire (Watt, 2012). Estos son equipos tecnológicos especializados, diseñados para el cultivo intensivo mediante la regulación de diversos factores nutricionales o físicos (Afreeen, 2006).

El sistema generalmente consta de un recipiente de cultivo y un bloque de control automatizado. El frasco de cultivo está diseñado para acomodar las células y tejidos cultivados en un ambiente aséptico y asegurar su máximo crecimiento, proporcionan oportunidades para mantener óptimas las condiciones micro-ambientales, nutricionales y las transferencias de gases.

El bloque de control automático puede ser computarizado, completamente automático o semi-automático. El mismo está diseñado para supervisar y controlar las condiciones de cultivo en el recipiente, tales como la velocidad de agitación, temperatura, O₂ disuelto y las concentraciones de CO₂, régimen de iluminación, pH, composición del medio gaseoso y el nivel del medio de cultivo líquido (Georgiev *et al.*, 2014).

Tipos de Biorreactores de inmersión Temporal

Existen cuatro clases principales de biorreactores: de fase líquida y gaseosa, biorreactores de inmersión temporal (BIT) y biorreactores híbridos (Georgiev *et al.* 2014).

Sistemas de Inmersión Temporal (SIT)

Los SIT son simples sistemas semiautomatizados, diseñados para proporcionar el ambiente más natural, mejorando la absorción de nutrientes y la transferencia de gases, así como un menor estrés mecánico para reducir trastornos fisiológicos y preservar la integridad morfológica del rápido crecimiento de las plantas cultivadas *in vitro*.

Existen diferentes variantes de SIT que se han desarrollado y aplicado extensamente en la propagación *in vitro* comercial de plantas de importancia económica (Watt, 2012). Por otra parte, debido a su diseño simple y un funcionamiento flexible, los SIT se han adaptado para la investigación, producción de metabolitos secundarios, proteínas recombinantes e incluso en la fitorremediación de compuestos tóxicos (Steingroewer *et al.*, 2013).

Tipos de Sistemas de Inmersión Temporal

Existen cuatro tipos principales de biorreactores: de fase líquida y gaseosa, biorreactores híbridos y los Sistema de Inmersión Temporal (SIT) (Georgiev *et al.*, 2014). Estos últimos serán descritos por su importancia en el desarrollo de la presente investigación.

Sistemas de Inmersión Temporal (SIT)

Existen diferentes variantes de SIT desarrollados y aplicados extensamente en la propagación *in vitro* comercial de plantas de importancia económica (Watt, 2012), de acuerdo con la clasificación referida por Berthouly y Etienne (2005) estos pueden ser: Sistema de Máquina Inclinatora, los Sistema de Inmersión Completa y Renovación de Medio de Cultivo, el Sistema de Inmersión Parcial.

Entre los diferentes tipos de Sistemas de Inmersión Parcial o Renovación se encuentran los Sistemas RITA® (Recipiente de Inmersión Temporal Automático) (CIRAD, distribuido por VITROPIC, Francia) (Watt, 2012). Los SETIS-VERTIT desarrollados por la empresa VERVIT de Bélgica y comercializados por Duchefa, Holanda (Georgiev *et al.*, 2014).

Sistemas RITA®

Los RITA® (recipiente de inmersión temporal automático) (CIRAD, distribuido por VITROPIC, Francia) se desarrollaron para el cultivo intensivo de brotes *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp.), plátano y banano (*Musa* spp.) y café (*Coffea canephora* cv. Robusta). El sistema consta de un recipiente de polipropileno autoclavable de 500 ml, con dos compartimientos, separados por una bandeja instalada con un soporte de malla y un tubo de plástico montado en su centro (Watt, 2012).

Biorreactor de Inmersión Temporal – BIT (Botellones iguales)

Es de los primeros de SIT desarrollados (Escalona *et al.* 1999). El mismo consiste en dos frascos iguales (de boca ancha, botellas o jarras), conectados entre sí por un tubo en U (vidrio o plástico) o de silicona. Uno de los contenedores tiene la función de un compartimiento del cultivo, mientras que el otro recipiente es utilizado como frasco de almacenamiento del medio de cultivo (Watt, 2012).

SETIS -VERVIT

Se basa en dos recipientes: el superior con los explantes y una capacidad de 6 L⁻¹ y el inferior con medio de cultivo y una capacidad de 3 L⁻¹. El drenaje es por gravedad y permite soplado adicional. El mismo se desarrolló por la empresa VERVIT de Bélgica y comercializados por Duchefa, Holanda (Georgiev *et al.*, 2014).

Termo-Foto-Biorreactores

Este biorreactor consiste en dos recipientes de vidrio Pyrex conectados por uniones de acero inoxidable y tubos. El recipiente superior es la cámara de cultivo. Está equipado con una chaqueta de agua para un control preciso de la temperatura y una fuente integral de luz UV, montados en la tapa superior (Sequeida *et al.*, 2012).

Sistema de Inmersión por Burbujeo

El biorreactor de inmersión por burbujas (BIB) utiliza una estrategia de cultivo totalmente nueva, basada en la inmersión temporal de los brotes *in vitro* en espuma en lugar de medio líquido, donde se emplea como detergente Tween 20 (Stanly *et al.*, 2010).

Usos de los Biorreactores de Inmersión Temporal Propagación *in vitro*

Los BIT se han utilizado para reducir el componente de mano de obra e intensificar el uso de medios de cultivo en estado líquido en la propagación *in vitro* de plantas. Además, se ha logrado incrementar los coeficientes de multiplicación respecto al medio de cultivo semisólido en múltiples especies de plantas por ejemplo en caña de azúcar (*Saccharum* spp.) (Lorenzo, 2000; Bernal *et al.* 2002; Martínez *et al.* 2020); en plátano (*Musa* spp.) (Aragón *et al.* 2010); en eucalipto (*Eucalyptus globulus* L.) (González *et al.* 2011); en ñame (*Discorea* spp.) (Jova *et al.* 2012); en arándano (*Vaccinium corymbosum* L.), (Arencibia *et al.* 2013); en piña (*Ananas comosus* L.Merr) (Aragón, 2015); en anthurium (*Anthurium andreaeanum* L.) (Alamilla-Magaña *et al.* 2019); en híbrido de durazno (*Prunus persica* x *P. amygdalus*) (Delfino *et al.* 2020); vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. Ex Andrews.) (Ramírez-Mosqueda y Bello-Bello, 2021); en pitahaya (*Hylocereus undatus*.) (Bello-Bello *et al.* 2021).

La tecnología de inmersión temporal tipo BIT consiste en baterías de dos recipientes translúcidos, además de mangueras de silicona esterilizables, filtros hidrofóbicos de 0,2 µm, electroválvulas, un compresor de aire y un interruptor horario programable. Con lo cual se garantizará el suministro de aire y nutrientes a intervalos de tiempo regulados, cuya frecuencia se establece según la especie vegetal (Escalona *et al.* 1999).

El flujo de aire permite el burbujeo del medio de cultivo que provoca un movimiento desordenado de los brotes *in vitro* y renueva la atmósfera dentro del frasco, lo cual evita la acumulación de gases tóxicos. El retorno del medio de cultivo líquido al frasco reservorio evita la muerte de los tejidos por asfixia, así garantiza la utilización económica y eficiente de los nutrientes (Sengar *et al.* 2011).

Santana *et al.* (2014) realizaron cambios tecnológicos al proceso de propagación de la caña de azúcar (*Saccharum* spp.) como son: la automatización de los BIT, uso de bioválvula que regula todas las funciones y luz tipo LED para incrementar la eficiencia, rentabilidad, disminución de costos del proceso y ofrecieron un modelo que sirve a otros

sistemas productivos de plantas *in vitro* en condiciones de aclimatización, a escala de Biofábrica o laboratorios comerciales.

Otros factores que se deben tener presente al utilizar los BIT como método de propagación *in vitro* en caña de azúcar (*Saccharum* spp.) son: la densidad de inóculo, la producción de brotes, la calidad final de las plantas con el incremento significativo de los coeficientes de multiplicación (Bernal *et al.* y De Feria *et al.* 2002).

Se han utilizado también para la multiplicación y germinación de embriones somáticos en diferentes especies como el café (*Coffea canephora* cv. Robusta), llegando a producir más de 600 000 plántulas (Ducos *et al.* 2007) y en banano (*Musa* spp.) cv. FHIA-18 (AAAB) para la germinación de los embriones somáticos (Gómez *et al.* 2002).

Producción de proteínas recombinantes

Uso de plantas transgénicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) fundamentalmente para la producción de determinadas proteínas de interés farmacéutico (Huang y McDonald, 2012).

Producción de metabolitos secundarios en BIT

La comercialización de la tecnología de plantas *in vitro* podría ser considerada como una alternativa más para el suministro sostenible de valiosos fitoquímicos en un futuro próximo (Georgiev y Weber, 2014; Georgiev *et al.* 2014). Puesto que la biosíntesis de algunos metabolitos secundarios en plantas puede implicar la participación de varias vías biosintéticas. Durante los últimos años, la mayor atención se ha centrado en el cultivo de brotes *in vitro* y raíces transformadas para la producción de metabolitos secundarios (Tabla 1).

Tabla 1. Ejemplos del uso de los distintos tipos de BIT en la producción de biomasa con metabolitos secundarios en diferentes especies de plantas.

Especie	Tipo de material vegetal	Tipo de metabolito	Tipo de SIT	Autores
<i>Digitalis purpurea</i> L.	brotes	cardenólidos	BIT	Pérez-Alonso <i>et al.</i> (2009)
<i>Digitalis lanata</i> L.	brotes	cardenólidos	BIT	Pérez-Alonso <i>et al.</i> (2012)
<i>Leucojum aestivum</i>	brotes	galantamina	BIT	Schumann <i>et al.</i> (2012)
<i>Datura stramonium</i>	Raíces transformadas	hyosciamine	RITA®	Georgiev <i>et al.</i> (2008)
<i>Beta vulgaris</i>	Raíces transformadas	betalanina	RITA®	Pavlov y Bley (2008)
<i>Leucojum aestivum</i>	brotes	galantamina	RITA®	Ivanov <i>et al.</i> (2012)
<i>Pancratium maritimum</i>	brotes	alcaloide	RITA®	Georgiev <i>et al.</i> (2013)

<i>Harpagophytum procumbens</i>	Raíces transformadas	Iridoide	Sistema de Inmersión por Burbujeo	Ludwing-Muller <i>et al.</i> (2008)
<i>Panax ginseng</i>	Raíces transformadas	ginsenoside	Biorreactores Tipo Wave	Palazon <i>et al.</i> (2003)
<i>Nicotiana tabacum</i>	Raíces transformadas	geraniol	Biorreactores Tipo Wave	Ritala <i>et al.</i> (2014)
<i>Deschampsia antarctica</i>	brotes	fenoles	Termo-Foto-Biorreactores	Sequeida <i>et al.</i> (2012)
<i>Saccharum spp.</i>	brotes	fenoles	SIT	Arencibia <i>et al.</i> (2012)
<i>Saccharum spp.</i>	brotes	fenoles	SIT	Bernal (2019)

CONCLUSIONES

La revisión bibliográfica realizada permite la actualización del uso de los distintos tipos de Biorreactores de Inmersión Temporal para la propagación *in vitro* de plantas, producción de proteínas recombinantes y metabolitos secundarios.

BIBLIOGRAFÍA

- AFREEN, F. 2006. Temporary immersion bioreactor, In: Gupta, S. D. and Y. Ibaraki (eds). *Plant Tissue Culture Engineering*. Springer Netherlands, p. 187-201.
- ALAMILLA-MAGAÑA, J.C.; J.H. CAAMAL-VELÁZQUEZ, M.A. CRIOLLO-CHAN; J.E. VERA-LÓPEZ; J.A. REYES-MONTERO. 2019. Biofactory and temporary immersion bioreactor: *In vitro* propagation of *Anthurium andreanum* L., and economic viability. *Revista Agroproductividad*, 12(10): 23-29.
- ALVARD, D.; F. COTE and C. TEISSON. 1993. Comparison of methods of liquid médium culture for banana micropropagation. Effects of temporary immersion of explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32: 55-60.
- ARAGÓN, C.E. 2015. Physiological characteristics as analyzed by hormone profile, metabolic pathways and expression of specific induced genes of C3, C4 and CAM tropical crops propagated by Temporary Immersion Bioreactors (TIB). Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agronómica. Instituto de Agronomía, "Universidad Técnica de Lisboa". 142 p.
- ARAGÓN, C.E.; M. ESCALONA; R. RODRÍGUEZ; M.J. CAÑAL; I. CAPOTE; D. Pina and J. GONZÁLEZ-OLMEDO. 2010. Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 46:89-94.
- ARENCIBIA, A.D.; C. VERGARA; K. QUIROZ; B. CARRASCO. 2013. An approach for micropropagation of blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) plants mediated by temporary immersion bioreactors (TIBs). *Am. Journal Plant Sciencie*, 4(5): 1022-1028.
- ARENCIBIA, A.D.; A. BERNAL VILLEGAS; C.M. ZAYAS; E.R. CARMONA; C. CORDERO; G. GONZÁLEZ; R. GARCÍA and I. SANTANA. 2012. Hydrogen peroxide induced phenylpropanoids pathway eliciting a defensive response in plants

- micropropagated in Temporary Immersion Bioreactors (TIBs). *Plant Science*, 195: 71-79.
- BELLO-BELLO, J.J.; S. SCHETTINO-SALOMÓN; J. ORTEGA-ESPINOZA. 2021. A temporary immersion system for mass micropropagation of pitahaya (*Hylocereus undatus*). 3 *Biotech*, 11(437): 2-8.
- BERNAL VILLEGAS, A. 2019. Compuestos fenólicos de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) obtenidos en Biorreactores de Inmersión Temporal con actividad protectora contra patógenos. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícola. Universidad Agraria de la Habana "Fructuoso Rodríguez". 95p.
- BERNAL VILLEGAS, A. Z. OCCEGUERA; M. JIMÉNEZ; O. RIVERA; L. GARCÍA and M. DE FERIA. 2002. Use of the Temporary Immersion Systems for sugarcane vitroplants production. *Biotechnología Vegetal*, 2(4): 201-206.
- BERTHOULY, M.; H. ETIENNE. 2005. Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. In: Hvoslef-Eide, A.K. and W. Preil (eds). Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation. *Springer, Dordrecht*. 165-195.
- DE FERIA, M.; E. JIMÉNEZ; M. CHÁVEZ. 2002. Empleo de sistemas de inmersión temporal para la multiplicación *in vitro* de brotes de *Saccharum* spp. var. IBP 89-112. *Biotechnología Vegetal*, 2(3): 143-147.
- DELFINO, P.; R. RIVATA; P. BIMA. 2020. Sistema de Inmersión Temporal (SIT): alta eficiencia en la propagación *in vitro* del portainjerto híbrido *Prunuspersica* x *P. amygdalus*. *Nexo Agropecuario*, 8(1): 13-18.
- DUCOS, J.P.; L. CHARLES; P. VINCENT. 2007. Bioreactors for coffee mass propagation by somatic embryogenesis. *International Journal of Plant Developmental Biology*, 1(1): 1-12.
- ESCALONA, M.; J.C. LORENZO; B. GONZÁLEZ; M. DAQUINTA; Z. FUNDORA; C.G. BORROTO; D. ESPINOSA; E. ARIAS and M.E. ASPIOLEA. 1999. New system for *in vitro* propagation of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr). *Pineapple News*, 5:5-7.
- GEORGIEV, M. and J. WEBER. 2014. Bioreactors for plant cells: hardware configuration and internal environment optimization as tools for wider commercialization. *Biotechnology Lett*, 1-9.
- GEORGIEV, V.; A. SCHUMANN; A. PAVLOV and T. BLEY. 2014. Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in Life Sciences*, 14(6): 1-15.
- GEORGIEV, V.; I. IVANOV; S. BERKOV and A. PAVLOV. 2013. Temporary immersion systems for Amaryllidaceae alkaloids biosynthesis by *Pancratium maritimum* L. shoot culture. *J. Plant Biochem. Biotechnol*, 17(1):33-44.
- GEORGIEV, V.; M. ILIEVA; T BLEY and A. PAVLOV. 2008. Betalain production in plant *in vitro* systems. *Acta Physiology Plant*, 30: 581-593.
- GÓMEZ- KOSKY, R.; M. DE FERIA; L. POSADA; T. GILLIARD; F.M. BERNAL; M.V. REYES; M.M. CHÁVEZ and E.M. QUIALA. 2002. Somatic embryogenesis of the banana hybrid cultivar 'FHIA-18' (AAAB) in liquid medium and scale-up in a bioreactor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68: 21-26.
- GONZÁLES, R.; S. RÍOS; F. AVILÉS and M. SÁNCHEZ-OLATE. 2011. *In vitro* multiplication of *Eucalyptus globulus* by temporary immersion system. *Bosque*. (in spanish), 32:147-154.
- HUANG, T.K. and K.A. McDONALD. 2012. Bioreactor systems for *in vitro* production of foreign proteins using plant cell cultures. *Biotechnol. Adv.*, 30: 398-409.

- IVANOV, I.; V. GEORGIEV; S. BERKOV and A. PAVLOV. 2012. Alkaloid patterns in *Leucosium aestivum* shoot culture cultivated at temporary immersion conditions. *Journal Plant Physiology*, 169: 206-211.
- JIMÉNEZ, E.; N. PÉREZ- ALONSO; M. DE FERIA; R. BARBÓN; A. CAPOTE; M. CHÁVEZ; E. QUIALA and J.C. PÉREZ. 1999. Improved Production of potato microtubers using a Temporary Immersion System. *Plant Cell Tiss Org Cult.*, 59: 19-23.
- JOVA, M.; R. GÓMEZ-KOSKY; E.E. CUELLAR and A.E. CUELLAR. 2012. Efficiency of semi-automated culture systems on microtubers formation of yam (*Discorea alata* L.). *Biotechnology. Agron. Soc. Environ.*, 16: 45-47.
- LORENZO, J. C. 2000. Micropropagación de la caña de azúcar en Sistemas de Inmersión Temporal. Tesis para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Centro de Bioplasmas. UNICA. 100 p.
- LUDWING-MULLER, J.; M. GEORGIEV and T. BLEY. 2008. Metabolite and hormonal status of hairy root cultures of Devil's claw (*Harpagophytum procumbens*) in flasks and in a bubble column bioreactor. *Process Biochemistry*, 43(1): 15-23.
- MARTÍNEZ RIVERO, A.; M.A. RAMÍREZ-MOSQUEDA; O. MOSQUEDA FRÓMETA; M. ESCALONA MORGADO, M. RIVAS PANECA; R. C. RODRÍGUEZ ESCRIBA; M. A. DAQUINTA GRADAILLE; J. J. BELLO-BELLO. 2020. Influence of Vitrofur® on sugarcane micropropagation using temporary immersion system. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 141: 447-453.
- PALAZÓN, J.; A. MALLOL; R. EIBL; C. LETTENBAUER; R.M. CUSIDÓ and M.T. PIÑOL. 2003. Growth and ginsenoside production in hairy root cultures of *Panax ginseng* using a novel bioreactor. *Planta Médica*, 69(4): 344-349.
- PAVLOV, A. and T. BLEY. 2008. Betalains biosynthesis by *Beta vulgaris* L. hairy root culture in a temporary immersion cultivation system. *Process Biochem*, 41: 848-852.
- PÉREZ-ALONSO, N.; A. CAPOTE; A. GERTH and E. JIMÉNEZ. 2012. Increased cardenolides production by elicitation of *Digitalis lanata* shoots cultured in temporary immersion systems. *Plant Cell Tiss. Organ Cult*, 110: 153-162.
- PÉREZ-ALONSO, N.; D. WILKEN; A. GERTH; A. JAHN; H.M. NITZSCHE; G. KERNS; G. CAPOTE-PÉREZ and E. JIMÉNEZ. 2009. Cardiotonic glycosides from biomass of *Digitalis purpurea* L. cultured in temporary immersion systems. *Plant Cell. Tissue. Organ Cult*, 99: 151-156.
- RAMÍREZ-MOSQUEDA, M. A.; J.J. BELLO-BELLO. 2021. SETIS™ bioreactor increases *in vitro* multiplication and shoot length in vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. Ex Andrews). *Acta Physiol Plant*, 43-52.
- RITALA, A.; L. DONG; N. IMSENG and T. SEPPÄNEN-LAAKSO. 2014. Evaluation of tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1) hairy roots for the production of geraniol, the first committed step in terpenoid indole alkaloid pathway. *Journal Biotechnology*, 176: 20-28.
- SANTANA, I.; J. RODRÍGUEZ; O. NODARSE; A. BERNAL VILLEGAS; J.L. MONTE DE OCA; M. JIMÉNEZ; P. MACHADO; J.M. ROLO, A. PÉREZ y C.M. ZAYAS. 2014. Biofábrica de 5^{ta} generación. En XXXVI Convención y EXPOATAM 2014 "Héctor M. Sáenz Couret", septiembre 2 al 5 de 2014. *Revista ATAM*, México. ISSN: 2007610: 10 p.

- SCHUMANN, A.; S. BERKOV; D. CLAUS and A. GERTH. 2012. Production of galanthamine by *Leucojum aestivum* shoots grown in different bioreactor systems. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 167: 1907-1920.
- SENGAR, K.; R.S. SENGAR and G.S. KUMAR. 2011. The effect of *in vitro* environmental conditions on some sugarcane varieties for micropropagation. *Afr. J. Biotechnol*, 10(75): 17122-17126.
- SEQUEIDA, A.; E. TAPIA; M. ORTEGA; P. ZAMORA; A. CASTRO; C. MONTES; G.E. ZÚÑIGA and H. PRIETO. 2012. Production of phenolic metabolites by *Deschampsia antarctica* shoots using UV-B treatments during cultivation in a photobioreactor. *Electronic Journal of Biotechnology*, 15(4): 10-18.
- STANLY, C.; A. BHAT; A.M.D. ALI; C. L. KENG and B.P. LIM. 2010. A comparative study of *Curcuma zedoaria* and *Zingiber zerumbet* plantlet production using different micropropagation systems. *Afr. J. Biotechnol*, 9: 4326-4333.
- STEINGROEWER, J.; T. BLEY; V. GEORGIEV; I. IVANOV; C. STANLY; A. BHATT; A.M.D. ALI; C. L. KENG and B.P. LIM. 2013. Bioprocessing of differentiated plant *in vitro* systems. *Eng. Life Sc*, 13: 26-38.
- WATT, P. 2012. The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. *Africa. J. Biotechnol*, 3(3): 14025-14035.