

Efecto de la frecuencia de inmersión y la disponibilidad de medio de cultivo en la multiplicación del cultivar híbrido FHIA-21 (*Musa AAAB*) en sistemas de inmersión temporal

Manuel de Feria Silva*, Elisa Quijala, Maité Chávez, Lester Molejón, Elizabet Peralta, Marilyn Hernández, Alexis Rodríguez, Deibis Mirabal, Yudith Sánchez. *Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuani km 5.5. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. mdeferia@ibp.co.cu o mdeferia@yahoo.es

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivos estudiar el efecto de la frecuencia de inmersión y la disponibilidad de medio de cultivo por brote en la multiplicación del cultivar híbrido FHIA-21 con el uso de sistemas de inmersión temporal. Se demostró que es posible multiplicar este material vegetal en sistemas con frascos de cultivo de dos capacidades diferentes y que los resultados que se pueden obtener son superiores a los obtenidos en medio de cultivo semisólido. Con frascos de 1.0 litro de capacidad se logró un coeficiente de multiplicación de 4.95 con cuatro inmersiones al día después de 25 días de cultivo, mientras que los mejores resultados con sistemas de inmersión temporal de 10 litros de capacidad se lograron también con cuatro inmersiones al día, pero con 50 ml de medio de cultivo por brote, con lo cual se alcanzó un total de 370 brotes por sistema de inmersión temporal y un coeficiente de multiplicación de 6.16. Se comprobó que los brotes del cultivar híbrido FHIA-21 pudieron ser multiplicados durante varios subcultivos sucesivos en estos sistemas y no se observó la presencia de brotes hiperhidratados.

Palabras clave: automatización, medio de cultivo líquido, plátano

ABSTRACT

The present work had as objectives to study the effect of the immersion frequency and the availability of culture medium per shoot in the multiplication of the cultivar hybrid FHIA-21 using temporary immersion systems. It was demonstrated that it is possible to multiply this plant material in systems with culture flasks of two different capacities, obtaining superior results than in semisolid culture medium. A multiplication rate of 4.95 was achieved with flasks of 1.0 litre of capacity after 25 days of culture with four immersions a day, while the best results with temporary immersion systems of 10 litres of capacity were also obtained with four immersions a day, but using 50 ml of culture medium per shoot, reaching a total of 370 shoots by temporary immersion systems and a multiplication rate of 6.16. It was proven that the shoot of cultivar hybrid FHIA-21 could be multiplied during several successive subcultures in these systems and the presence of hiperhydrated shoot was not observed.

Key words: automation, banana, liquid culture medium

INTRODUCCIÓN

Cuba dedica grandes extensiones de tierra a la producción de diferentes cultivares de plátanos y bananos híbridos obtenidos por la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA). Uno de ellos, el FHIA-21 (*Musa AAAB*), ha despertado el interés de los productores nacionales como una alternativa para la producción de plátano vianda. Sin embargo, la poca disponibilidad de material vegetal certificado para ser utilizado como semilla, ha limitado que se extienda rápidamente por todo el país.

Una posible solución a este problema está en las potencialidades que brinda el cultivo *in vitro*. En Cuba, la propagación *in vitro* vía organogénesis de determinados genotipos de plátanos y bananos a escala comercial se ha convertido en una metodología de rutina. Sin embargo, para el caso de la mayoría de los cultivares híbridos de la FHIA, las metodologías que se aplican requieren ser optimizadas.

En particular, la propagación *in vitro* a escala comercial del FHIA-21 en medio de cultivo en estado

semisólido ha presentado muy bajos coeficientes de multiplicación, lo que limita el número de plantas producidas *in vitro* que se pueden obtener a partir de una planta seleccionada en campo.

Estos elementos, unidos al elevado número de operaciones manuales que es necesario realizar al tener que limpiar, llenar y manipular un gran número de frascos de cultivo (Maene y Debergh, 1985) y cortar y manipular posteriormente los brotes en condiciones asépticas (Chu, 1995) hacen que sin lugar a dudas se incrementen los costos de producción.

El uso de medios de cultivo en estado líquido en algunas o todas las fases de la propagación *in vitro*; puede reducir los costos y la manipulación *in vitro*, y permite aplicar la automatización a estos procesos (Debergh, 1988; Aitken-Christie, 1991).

Los sistemas de inmersión temporal (SIT) constituyen una tecnología accesible que permite automatizar algunas fases del cultivo *in vitro*, con lo cual se ahorra

tiempo y mano de obra durante el proceso de escalado (Etienne y Berthouly, 2002).

También se logra un aumento en la eficiencia biológica y productiva del material vegetal bajo estas condiciones respecto al propagado en medios de cultivo en estado semisólido y se reducen daños colaterales causados por los medios de cultivo en estado líquido y estáticos conocidos como hiperhidricidad e hipoxia (Krueger *et al.*, 1991; Alvard *et al.*, 1993; Berthouly *et al.*, 1995; Lorenzo *et al.*, 1998; Escalona *et al.*, 1999).

Esto se debe en lo fundamental a que en los SIT se combinan las ventajas de los medios de cultivo en estado semisólido (máximo intercambio de gases) y los medios de cultivo en estado líquido (incremento en la toma de nutrientes) y está claro que la frecuencia y el tiempo de inmersión son parámetros de cultivo muy importantes, que definen el comportamiento del material vegetal cuando se emplean SIT (Berthouly y Etienne, 2005).

Por todo lo anteriormente planteado, el presente trabajo tuvo como objetivos estudiar el efecto de la frecuencia de inmersión y la disponibilidad de medio de cultivo por brote, en la multiplicación del cultivar híbrido FHIA-21 en sistemas de inmersión temporal como una alternativa para mejorar su respuesta al cultivo *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Condiciones generales

Los sistemas de inmersión temporal (SIT) se colocaron en estantes diseñados y habilitados para su funcionamiento (Figura 1), los mismos se ubicaron en una cámara de crecimiento de luz solar de la Biofábrica del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), la densidad de flujo de fotones fotosintéticos osciló entre $100-125 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, con una temperatura de cultivo de $28 \pm 2.0^\circ\text{C}$.

Como material vegetal se utilizaron plantas *in vitro* del cultivar híbrido FHIA-21 propagadas por organogénesis que tenían tres subcultivos en medio de cultivo de multiplicación en estado semisólido, las cuales fueron suministradas para esta investigación por el Banco de Germoplasma del IBP.

Previo a la inoculación por primera vez de los SIT, el material vegetal fue colocado en frascos de vidrio con una capacidad total de 250 ml, a los cuales se les añadieron 15 ml de medio de cultivo en estado líquido compuesto por el 100% de las sales MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con $3.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de 6-bencilaminopurina, $2.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de ácido indolacético, $1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de tiamina, 3.0% de sacarosa y pH ajustado a 5.8 antes de la esterilización.

Estos frascos de cultivo una vez inoculados, fueron colocados en un agitador orbital a 80 r.p.m. durante cinco días en la misma cámara de crecimiento con luz solar donde fueron instalados los estantes de inmersión temporal. Este paso previo a la inoculación de los SIT se realizó con el objetivo de descartar la posible presencia de explantes contaminados provenientes del medio de cultivo en estado semisólido, donde se hace más difícil la confirmación visual de posible contaminación microbiana generada fundamentalmente por bacterias.

Los experimentos fueron divididos en dos etapas, una primera donde se emplearon SIT con frascos de 1.0 litro de capacidad para evaluar el efecto de la frecuencia de inmersión y la factibilidad o no de aplicar esta tecnología al cultivar híbrido FHIA-21 y una segunda etapa en la cual se utilizaron frascos de 10 litros de capacidad similares a los que se emplearían en un posible escalado de la producción a nivel comercial y en los cuales se evaluó el efecto de la disponibilidad de medio de cultivo por brote.



Figura 1. Estantes habilitados en una cámara de crecimiento de luz solar de la Biofábrica del IBP para el funcionamiento de los sistemas de inmersión temporal.

El medio de cultivo en estado líquido empleado en todos los experimentos tuvo una composición similar al descrito anteriormente.

Los SIT de 1.0 litro de capacidad y los frascos de cultivo empleados para los controles, fueron esterilizados durante 20 minutos en autoclave a 1.2 kg.cm⁻² de presión, lo que equivale a 121°C de temperatura, mientras que en el caso de los SIT de 10 litros de capacidad, estos fueron esterilizados en similares condiciones de presión y temperatura, pero durante 30 minutos.

Evaluación de la frecuencia de inmersión en SIT de 1 litro

Se estudió el efecto de dos (cada 12h) y cuatro inmersiones por día (cada 6h), con un minuto de duración como tiempo de inmersión en la multiplicación del cultivar híbrido FHIA-21, la densidad de inóculo empleada fue de 20 brotes por SIT de 1.0 litro de capacidad.

La manipulación realizada al material vegetal para inocular por primera vez los SIT fue definida a partir de resultados obtenidos en investigaciones previas y consistió en decapitar los brotes aproximadamente a 1.0 cm por encima de la base y siempre que el brote principal estuvo acompañado de uno o más brotes pequeños (inferiores a 1.0 cm de altura), estos no fueron separados.

Por cada tratamiento se inocularon tres SIT como réplica. El volumen de medio de cultivo por SIT fue de 0.5 litros, es decir, 25 ml por brote.

También a partir de resultados preliminares con este mismo cultivar híbrido se definió en 25 días la duración de cada subcultivo, transcurrido ese tiempo se determinó el número de brotes por SIT y se calculó el coeficiente de multiplicación dividiendo el número de brotes obtenidos entre la cantidad inicialmente inoculada.

Como tratamiento control se colocaron 10 brotes por frascos de vidrio con una capacidad total de 250 ml, a los cuales se les añadieron 20 ml de medio de cultivo en estado semisólido de similar composición al descrito anteriormente, lo que representó 2.0 ml de medio de cultivo disponible por brote. Se inocularon un total de 20 frascos de cultivo, donde cada frasco fue considerado como una réplica.

Disponibilidad de medio de cultivo por brote en SIT de 10 litros

Al incrementarse la capacidad del frasco de cultivo a SIT de 10 litros de capacidad, se realizaron dos experimentos para evaluar el efecto de la disponibilidad de medio de cultivo por brote, tanto con dos (cada 12h), como con cuatro inmersiones

por día (cada 6h) y observar, además, la posible presencia de brotes hiperhidratados.

En un primer experimento se aplicaron como tratamientos 25 y 50 ml de medio de cultivo por brote y dos inmersiones por día (cada 12h) con una duración de un minuto. Se inocularon 60 brotes por SIT y a modo de réplica tres SIT por cada tratamiento.

Para inocular los SIT el material vegetal fue cortado y manipulado según resultados obtenidos en investigaciones previas como se describe a continuación:

Cuando el grosor de la base de un brote era aproximadamente superior a los 5.0-6.0 mm, este fue decapitado a 1.0 cm por encima de la base y dividido en dos secciones aproximadamente iguales aun y cuando fuera un brote individual.

Cuando no alcanzaron el grosor antes señalado, sólo fueron decapitados aproximadamente a 1.0 cm por encima de la base, en ambas manipulaciones, cuando el brote principal estuvo unido con uno o más brotes pequeños (inferiores a 1.0 cm de altura aproximadamente), estos no fueron separados.

A los 25 días de cultivo se determinó el número de brotes obtenidos en cada tratamiento y se calculó el coeficiente de multiplicación de la misma forma que se explicó anteriormente y de manera visual se evaluó la presencia de posibles brotes hiperhidratados.

En un segundo experimento se aplicaron como tratamientos 25 y 50 ml de medio de cultivo por brote, pero con cuatro inmersiones por día (cada 6h), con similares condiciones a las descritas para el experimento anterior.

Para inocular estos SIT se emplearon brotes del experimento anterior del tratamiento con 50 ml de medio de cultivo por brote y se manipularon de manera similar a la explicada anteriormente, con la única excepción de que aquellos brotes que a pesar de cumplir con el grosor estimado para ser divididos, si no presentaron nuevos brotes pequeños a modo de ahijamiento, entonces no fueron divididos y solo se decapitaron a 1.0 cm por encima de la base, con el objetivo de permitir su recuperación, pues estudios preliminares permitieron conocer que si los brotes son constantemente divididos, se produce en el tiempo una reducción del coeficiente de multiplicación.

A los 25 días de cultivo se determinó el número de brotes obtenidos en cada tratamiento, se calculó el coeficiente de multiplicación y de manera visual se evaluó la presencia de posibles brotes hiperhidratados.

En ambos experimentos se empleó un tratamiento control similar al descrito al evaluar el efecto de la

frecuencia de inmersión con SIT de 1.0 litro de capacidad.

El procesamiento estadístico se realizó mediante el paquete SPSS para Windows versión 8.0 y dentro de este un ANOVA de clasificación simple con la correspondiente prueba Duncan.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Frecuencia de inmersión en SIT de 1 litro

Los mejores resultados al multiplicar el cultivar híbrido FHIA-21 en SIT de 1.0 litro de capacidad fueron obtenidos en el tratamiento con cuatro inmersiones por día (cada 6h) con diferencias estadísticas respecto a los demás tratamientos (Tabla 1).

Algunos autores han planteado que no se deben comparar las respuestas que se obtienen entre las plantas producidas *in vitro* en SIT y las plantas producidas *in vitro* en medio de cultivo en estado semisólido, debido a la gran diferencia que existe respecto a la disponibilidad de nutrientes para uno y otro caso. Sin embargo, para demostrar cuan eficiente puede resultar el empleo de los SIT en la multiplicación del cultivar híbrido FHIA-21 en relación con la propagación *in vitro* por métodos convencionales, se consideró válido hacer tal comparación.

Desde autores como Alvard *et al.* (1993), Escalona *et al.* (1999), Hempflig y Preil (2005), Li-Hua *et al.* (2005) hasta Wawrosch *et al.* (2005), hacen tales comparaciones a modo de reafirmar que para algunas especies de interés comercial, el empleo de los SIT como alternativa para su propagación supera desde todos los puntos de vista a la propagación mediante el empleo de medios de cultivo en estado semisólido.

Con dos inmersiones al día (cada 12h) (Figura 2A), los brotes mostraron un mayor desarrollo del área foliar, que los brotes obtenidos con cuatro inmersiones al día (cada 6h) (Figura 2B). Sin embargo, el mayor número de brotes en el tratamiento con cuatro inmersiones al día no sólo está directamente relacionado con la mayor disponibilidad de nutrientes al estar estos más tiempo en contacto con el medio de cultivo.

Autores como Hempflig y Preil (2005) al trabajar con *Phalaenopsis* sp. en SIT plantearon que al realizarse un mayor número de inmersiones al día se favoreció la ventilación y el intercambio de gases como el etileno y el CO₂ que al acumularse limitan la multiplicación de los brotes, razón por la cual es indispensable determinar la frecuencia de inmersión óptima para cada especie.

Tabla 1. Efecto de la frecuencia de inmersión sobre el número de brotes de FHIA-21 obtenidos después de 25 días de cultivo en sistemas de inmersión temporal de 1.0 litro de capacidad.

Tratamientos			
Número de inmersiones por día	Densidad de inóculo por frasco	Número de brotes	Coefficiente de multiplicación
2 (cada 12 h)	20 brotes	68 b	3.40
4 (cada 6 h)	20 brotes	99 a	4.95
Tratamiento control*	10 brotes	26.5 c	2.65

Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según la prueba de Duncan. * medio de cultivo semisólido.

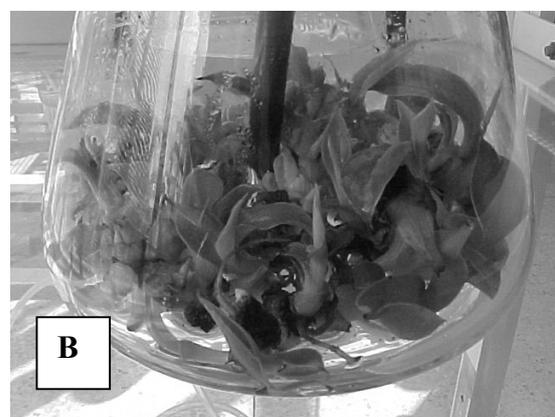


Figura 2. Brotes del cultivar híbrido FHIA-21 después de 25 días de cultivo en fase de multiplicación en SIT de 1.0 litro de capacidad y diferentes frecuencias de inmersión. (A) Brotes obtenidos con dos inmersiones al día (cada 12h). (B) Brotes obtenidos con cuatro inmersiones al día (cada 6h).

Albany *et al.* (2005) trabajando con SIT de 1.0 litro de capacidad, observaron una respuesta similar en cuanto al desarrollo del área foliar del cultivar de banano Gran Enano y recomendaron el empleo de retardadores del crecimiento como el paclobutrazol (PBZ) y el ancimídol (ANC) para dar solución a esta limitante.

Sin embargo, para el caso particular del cultivar híbrido FHIA-21 habría que realizar un estudio detallado al respecto, pues este cultivar es propenso a formar con facilidad yemas adventicias, y las sustancias propuestas por estos autores estimulan la formación de este tipo de estructuras que pueden dar lugar a variabilidad genética.

Los resultados obtenidos confirmaron que es posible emplear SIT para la multiplicación del cultivar híbrido FHIA-21 y lograr una mejor respuesta de los brotes respecto al empleo de los medios de cultivo en estado semisólido.

Disponibilidad de medio de cultivo por brote en SIT de 10 litros

Al multiplicar por segundo subcultivo consecutivo los brotes de FHIA-21 provenientes de los SIT de 1.0 litro de capacidad, en SIT de 10 litros, se observó una respuesta diferente de los brotes a la disponibilidad de nutrientes (Tabla 2).

Los brotes obtenidos en ambos tratamientos también presentaron un gran desarrollo del área foliar y longitud del pseudotallo, pero no se observó que estuvieran hiperhidratados.

Resultados similares relacionados con el desarrollo de los brotes fueron descritos por Jiménez (2005), este autor observó que los brotes del cultivar híbrido FHIA-18 presentaron un desarrollo excesivo del área foliar y del largo del pseudotallo, en SIT de 10 litros de capacidad similares a los utilizados en este experimento, lo cual, según este mismo autor, limita el número de brotes que se pueden obtener por frasco de cultivo y reduce la capacidad de las cámaras de crecimiento.

Autores como Ziv *et al.* (1998) y Escalona *et al.* (1999) trabajando con otros cultivos han aplicado retardadores del crecimiento para reducir o eliminar estos problemas. Esto mientras no se realice un estudio más abarcador al respecto, no es recomendable aplicar para este cultivar híbrido por lo explicado anteriormente.

Al incrementar el número de inmersiones de dos a cuatro por día y evaluar la influencia de la disponibilidad de medio de cultivo por brote en la multiplicación del cultivar híbrido FHIA-21 se observó un incremento considerable del número de brotes en el tratamiento con 50 ml de medio de cultivo por brote, con diferencias estadísticas respecto al tratamiento con 25 ml de medio de cultivo por brote y al control (Tabla 3).

Como consecuencia del aumento del número de brotes en los SIT, el coeficiente de multiplicación se incrementó en dos unidades al duplicar la disponibilidad de medio de cultivo por brote (Tabla 3). No se observaron brotes hiperhidratados.

En la figura 3 se pueden observar los brotes obtenidos en ambos tratamientos y como se logró reducir el tamaño de los brotes e incrementar el número de estos en el tratamiento con cuatro inmersiones y 50 ml de medio de cultivo por brote (Fig. 3B) respecto al tratamiento con 25 ml (Fig. 3B).

La calidad de los brotes que crecen en SIT puede variar durante los subcultivos debido a la adaptación de los mismos a estos sistemas (Berthouly y Etienne, 2005).

Autores como Krueger *et al.* (1991) demostraron que al incrementarse la capacidad de los frascos de cultivo, puede ser más eficiente la multiplicación de los brotes si las condiciones de cultivo son optimizadas, pero también los brotes pueden tener una mayor longitud, lo cual según Jiménez (2005), es un problema que dificulta más el manejo y el subcultivo de los brotes.

Tabla 2. Efecto de la disponibilidad de medio de cultivo sobre el número de brotes de FHIA-21 que se obtuvieron después de cinco subcultivos *in vitro* y dos subcultivos consecutivos en sistemas de inmersión temporal en frascos de 10 litros de capacidad y dos inmersiones al día (cada 12h).

Tratamientos				
Número de inmersiones por día	Densidad de inóculo por frasco	Medio de cultivo por brote (ml)	Número de brotes	Coeficiente de multiplicación
2 (cada 12h)	60 brotes	50	216 a	3.60
2 (cada 12h)	60 brotes	25	178 b	2.96
Tratamiento control *	10 brotes	2	23.5 c	2.35

Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según la prueba de Duncan. * medio de cultivo semisólido.

Tabla 3. Efecto de la disponibilidad de medio de cultivo sobre el número de brotes de FHIA-21 que se obtuvieron después de seis subcultivos *in vitro* y tres subcultivos consecutivos en sistemas de inmersión temporal en frascos de 10 litros de capacidad y cuatro inmersiones al día (cada 6h).

Tratamientos				
Número de inmersiones por día	Densidad de inóculo por frasco	Medio de cultivo por brote (ml)	Número de brotes	Coefficiente de multiplicación
4 (cada 6h)	60 brotes	50	370 a	6.16
4 (cada 6h)	60 brotes	25	250 b	4.16
Tratamiento control*	10 brotes	2	27	2.70

Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según la prueba de Duncan. * medio de cultivo semisólido.

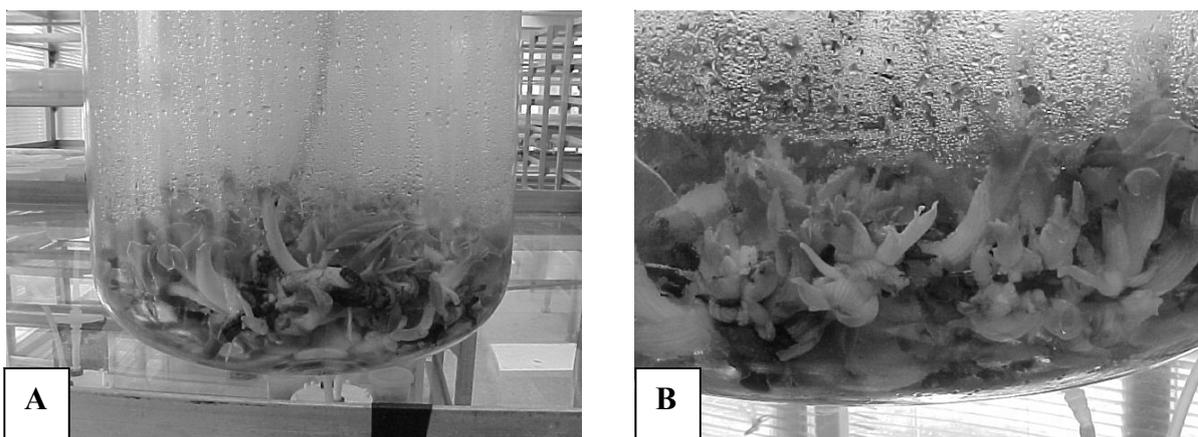


Figura 3. Brotes del cultivar híbrido FHIA-21 después de 25 días de cultivo en fase de multiplicación en SIT de 10 litros de capacidad, cuatro inmersiones por día y diferentes volúmenes de medio de cultivo por brote. (A) SIT con 25 ml por brote. (B) SIT con 50 ml por brote.

Sin embargo, para la aplicación comercial de los SIT se requiere de grandes frascos de cultivo (Jiménez, 2005) y el volumen de medio de cultivo en los SIT debe ser optimizado para no tener que realizar renovaciones del mismo (Etienne y Berthouly, 2002).

En este sentido, Lorenzo *et al.* (1998) determinaron que el volumen óptimo para multiplicar brotes de caña de azúcar (*Saccharum* sp.) fue 50 ml por brote. Estos mismos autores observaron en 30 días un incremento del coeficiente de multiplicación desde 8.3 hasta 23.9 al multiplicar por 10 la disponibilidad de medio de cultivo por brote.

Por su parte Escalona *et al.* (1999) obtuvieron que para la multiplicación eficiente de brotes de piña (*Ananas comosus* L. Merr) es necesario 200 ml de medio de cultivo por brote, también observaron que los volúmenes de medios de cultivo superiores a 200 ml por brote limitaron el coeficiente de multiplicación.

A partir de los resultados obtenidos en esta investigación se propone aplicar para la multiplicación del cultivar híbrido FHIA-21 durante 25 días de cultivo, SIT de 10 litros de capacidad, cuatro inmersiones por día con una duración de un minuto como tiempo de inmersión, una densidad de inoculación de 60

brotes por SIT, con una disponibilidad de 50 ml de medio de cultivo por brote, no realizar más de tres subcultivos sucesivos empleando SIT y aplicar para la manipulación de los brotes en cada subcultivo las indicaciones descritas en los materiales y métodos.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permitieron demostrar que es posible multiplicar durante tres subcultivos sucesivos brotes del cultivar híbrido FHIA-21 en medio de cultivo en estado líquido empleando sistemas de inmersión temporal, se demostró que tanto la frecuencia de inmersión como la disponibilidad de medio de cultivo por brote constituyen parámetros importantes a tener en cuenta a la hora de mejorar la respuesta de los brotes del cultivar híbrido FHIA-21 en fase de multiplicación empleando SIT.

REFERENCIAS

- Aitken-Christie, J (1991) Automation. En: Debergh PC, Zimmerman RJ (Eds) Micropropagation: Technology and Application, pp. 363–388. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Albany, N, Vilchez J, Jiménez E, García L, de FERIA M, Pérez N, Sarria Z, Pérez B, Clavelo J (2005) Use of growth retardants

- for banana (*Musa* AAA cv. Grand Naine) shoot multiplication in temporary immersion systems. En: Hvoslef-Eide AK, Preil W (Eds) Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation, pp. 231-242. Springer, Dordrecht
- Alvard, D, Côte F, Teisson C (1993) Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Effects of temporary immersion of explants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 32: 55–60
- Berthouly, M, Dufour M, Alvard D, Carasco C, Alemano L, Teisson C (1995) Coffee micropropagation in a liquid medium using the temporary immersion technique. En: ASIC Publishers (Eds.) 16th International Scientific Colloquium on Coffee, Kyoto, pp. 514-519. Vevey
- Berthouly, M, Etienne H (2005) Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. En: Hvoslef-Eide AK y Preil W (Eds) Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation, pp. 165-195. Springer, Dordrecht
- Chu, I (1995) Economic analysis of automated micropropagation. En: Aitken-Christie J, Kozai T, Smith MAL (Eds) Automation and Environmental Control in Plant Cell, Tissue Culture, pp. 19-27. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Debergh, P (1988) Improving mass propagation of *in vitro* plantlets. En: Kozai, T (Ed) Horticulture in High Technology Era, pp. 45-57. International Symposium on High Technology in Protected Cultivation, Tokyo
- Escalona, M, Lorenzo JC, González B, Daquinta M, González JL, Desjardins Y, Borroto CG (1999) Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Report*, 18: 743–748
- Etienne, H, Berthouly M (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 69: 215–231
- Hempfling, T, Preil W (2005) Application of a temporary immersion system in mass propagation of *Phalaenopsis*. En: Hvoslef-Eide AK, Preil W (Eds) Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation, pp. 231-242. Springer, Dordrecht
- Jiménez, E (2005) Mass propagation of tropical crops in temporary immersion systems. En: Hvoslef-Eide AK, Preil W (Eds) Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation, pp. 197-211. Springer, Dordrecht
- Krueger, S, Robacker C, Simonton W (1991) Culture of *Amelanchier* × *grandiflora* in a programmable micropropagation apparatus. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 27: 219–226
- Li-Hua Zhu, Xue-Yuan Li, Welander M (2005) Optimisation of growing conditions for the apple rootstock M26 grown in RITA containers using temporary immersion principle. En: Hvoslef-Eide AK, Preil W (Eds) Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation, pp. 253-261. Springer, Dordrecht.
- Lorenzo, JC, Gonzalez BL, Escalona M, Teisson C, Espinosa P, Borroto C (1998) Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 54: 197–200
- Maene, L, Debergh P (1985) Liquid medium additions to established tissue cultures to improve elongation and rooting *in vivo*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 5: 23-33
- Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15: 473-497
- Wawrosch, A, Kongbangkerd A, Kopf A, Kopp B (2005) Shoot regeneration from nodules of *Charybdis* sp: A comparison of semisolid, liquid and temporary immersion culture systems. En: Hvoslef-Eide AK, Preil W (Eds) Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation, pp. 275-280. Springer, Dordrecht
- Ziv, M, Ronen G, Raviv M (1998) Proliferation of meristematic clusters in disposable presterilized plastic bioreactors for the large-scale micropropagation of plants. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 34: 152-158