

Evaluación de biorreactores con y sin inyección de aire para la micropropagación de *Vanilla planifolia* G. Jackson

Clara Anabel Arredondo-Ramírez¹

Gregorio Arellano-Ostoa^{1,§}

Sergio Humberto Chávez-Franco¹

Eduardo García-Villanueva¹

María del Carmen López-Reyna²

José Humberto Caamal-Velázquez³

1 Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad-Fruticultura-Campus Montecillo-Colegio de Postgraduados. Carretera Mexico-Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México México. CP. 56230. Tel. 55 58045900. (anabel-is01@hotmail.com; sergiocf@colpos.mx; egarciav@colpos.mx).

2 Postgrado en Socioeconomía, Estadística e Informática-Economía. Campus Montecillo-Colegio de Postgraduados. Carretera Mexico-Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. Tel. 55 58045900. (creyna@colpos.mx).

3 Bioprospección y Sustentabilidad Agrícola en Trópico-Campus Campeche-Colegio de Postgraduados. Carretera Haltunchén-Edzná, Champotón, Campeche. México. CP. 24450. (hcaamal@colpos.mx).

Autor para correspondencia: arellano@colpos.mx.

Resumen

La especie *Vanilla planifolia* G. Jackson, tiene un alto valor comercial en la industria alimentaria, en la farmacéutica y la cosmética. Los sistemas de inmersión temporal o biorreactores permiten una propagación *in vitro* más rápida y controlada en condiciones de laboratorio. Sin embargo, debido a los altos costos de los biorreactores comerciales, por ejemplo, el modelo Rita®, uno de los más utilizados para la micropropagación de varias especies vegetales, se buscan alternativas más económicas. Se realizó la multiplicación *in vitro* de vainilla en dos tipos de biorreactores de inmersión temporal, con el objetivo de evaluar la eficiencia de un biorreactor mecánico sin inyección de aire en comparación con un biorreactor tipo Rita® que utiliza la inyección de aire; llevándose a cabo la investigación entre los años 2023-2024. Se utilizó el sistema de cultivo en semi sólido como testigo. Después de 30 días de cultivo se analizaron las variables fisiológicas: número de brotes, número de hojas, longitud de brotes e índice de crecimiento; así como, la cuantificación de variables bioquímicas como contenido total de clorofilas α y β , contenido de fenoles y carbohidratos. Los resultados obtenidos indicaron que, el biorreactor BSA fue estadísticamente igual ($p \leq 0.05$) al biorreactor Rita® en las variables número y longitud de brotes. Ambos resultaron estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$) al sistema semi sólido en la mayoría de las variables evaluadas. Esto sugiere que el uso de un biorreactor mecánico sin la inyección de aire puede ser usado como una alternativa por su bajo costo para la micropropagación de diversas especies.

Palabras clave:

micropropagación, mecánico, medios líquidos, Rita®, vainilla.

Introducción

La reproducción de especies vegetales es, sin duda, clave para el desarrollo humano. Tratando de cubrir las demandas solicitadas tanto en número de especies como en la reducción de costos, se ha abordado la micropropagación a gran escala utilizando sistemas de inmersión temporal (SIT), esta técnica realiza inmersiones periódicas y semiautomatizadas basadas en la alternancia de ciclos de inmersión temporal del tejido vegetal cultivado en medio líquido (Georgiev *et al.*, 2014).

Es decir; los biorreactores de inmersión temporal operan mediante ciclos de inmersión y emersión, por medio de un compresor se inyecta aire al biorreactor y al entrar en contacto con el medio líquido este rocía los brotes. Este ciclo se repite varias veces, creando un ambiente ideal para el crecimiento eficiente de los brotes. Generalmente el periodo de inmersión es corto, de tan sólo unos minutos, mientras que el periodo de exposición es más prolongado. La duración de las inmersiones depende en su gran mayoría de la especie con la que se esté trabajando. En estos sistemas se permite una mayor disponibilidad de todos los componentes del medio.

Un sistema de inmersión temporal (SIT) se ha destacado como un recurso para facilitar la micropropagación de diversas especies agrícolas y forestales (Etienne *et al.*, 1997), aumentar el índice de multiplicación y reducir el tiempo necesario para este proceso. Además, ofrece importantes ventajas al disminuir la manipulación manual intensiva, reducir costos de producción y mejorar la calidad del material vegetal (Etienne y Berthouly, 2002).

El biorreactor tipo Récipient à Immersion Temporaire Automatique (Rita[®]) por sus siglas en francés, desarrollado a finales de los años 90's, es el más utilizado. A partir del cual, se han desarrollado varios modelos, que se pueden dividir en dos categorías: biorreactores abiertos que cuentan con inyección de aire, como son: frascos gemelos (Escalona *et al.*, 1999), Plantima[®] (Wu *et al.*, 2018), Setis[™] (Lotfi y Werbrouck, 2020), por mencionar algunos. Por otro lado, están los biorreactores cerrados que no utilizan inyección de aire, como el We Vitro by Magenta[®] y el biorreactor nacional BioMint[™] (Robert *et al.*, 2006).

Este tipo de tecnología se ha convertido en una opción poco accesible debido a sus altos costos y uso de instalaciones especializadas. Por lo tanto, se requieren desarrollar nuevos prototipos de biorreactores que usen tecnología más económica para satisfacer la demanda.

El objetivo de esta investigación fue evaluar un biorreactor mecánico sin inyección de aire, diseñado para ser más accesible al utilizar materiales de bajo costo, frente al biorreactor Rita[®] que opera con inyección de aire. Para la evaluación se utilizaron brotes de vainilla (*Vanilla planifolia* G.Jackson) establecidos *in vitro*, cuya importancia de propagación ha sido descrita y se determinó su eficiencia frente al biorreactor Rita[®] en comparación con el medio semi sólido durante la etapa de multiplicación.

Materiales y métodos

Material vegetal

Para la evaluación se llevó a cabo la multiplicación *in vitro* de vainilla, se utilizaron segmentos nodales de vainilla con una longitud aproximada de 4 cm, previamente establecidos *in vitro* en medio semi sólido.

Medio de cultivo

El medio de cultivo líquido para la multiplicación MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 0.2 mg L⁻¹ de BA (Benciladenina), 0.02 mg L⁻¹ de Ana (ácido naftalenacético) y 30 g L⁻¹ de sacarosa, mientras que para el medio de cultivo semisólido se agregó 7 g L⁻¹ de agar Sigma[®] como agente gelificante más 1 g L⁻¹ de carbón activado. El pH de los medios fue ajustado a 5.7 antes de la esterilización.

El medio se esterilizó en una autoclave a 1.5 kg cm^{-2} de presión a 121 °C durante 20 min. Los cultivos fueron incubados a $24 \pm 2 \text{ °C}$ y se mantuvieron bajo luz Led a $55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, con un fotoperiodo de 16:8 h luz/oscuridad. En un cuarto de incubación, dicho protocolo fue desarrollado en el laboratorio de biorreactores del PREGEP-Fruticultura.

Tratamientos

Se evaluó el comportamiento del biorreactor mecánico BSA comparándolo con un biorreactor comercial Rita[®] y un testigo en medio semisólido (SS). La evaluación se llevó a cabo durante dos subcultivos sucesivos de treinta días, con tres repeticiones por tratamiento. Se utilizó una frecuencia de Inmersión de dos min cada cuatro horas durante 30 días para todos los tratamientos de inmersión. Para el tratamiento testigo los explantes estuvieron en contacto con el medio gelificado durante todo el experimento.

Biorreactor mecánico BSA (T1). Es un recipiente con cuerpo de vidrio cilíndrico tipo Pyrex, que consta de una tapa hermética de plástico de polipropileno, Incluye un filtro de aire de $0.2 \mu\text{m}$ que permite la respiración del material vegetal. Su mecanismo de inmersión opera mediante un sistema mecánico que es controlado por un motor a pasos, el cual, al accionarse, sumerge los explantes en el medio de cultivo que se encuentran en una plataforma de plástico en reposo.

Biorreactor Rita[®] (T2): (Réciipient à Immersion Temporaire Automatique). Las características se describen en Etienne *et al.* (1997).

Testigo en medio semisólido SS (T3): consta de un frasco de vidrio que contiene los explantes que están en contacto constante con el medio de cultivo semisólido. Las especificaciones de cada tratamiento se observan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Características de los tratamientos (T) utilizados para la evaluación (volumen total, volumen de medio, número de explantes por biorreactor y volumen del medio por explante).

Tipo de biorreactor	Volumen total del recipiente (ml)	Volumen del medio de cultivo (ml)	Núm. de explantes por repetición	Volumen de medio por explante (ml)
T1 BSA	1 700	500	14	35.71
T2 Rita [®]	940	350	10	35
T3 testigo SS	455	100	10	10

VARIABLES EVALUADAS

Después de 30 días de cultivo con las condiciones descritas anteriormente fueron:

VARIABLES FISIOLÓGICAS

Número de brotes por biorreactor, número de hojas por explante, longitud de brotes e índice de crecimiento de material vegetal $IC =$

$$\frac{\text{Peso fresco final} - \text{Peso fresco inicial}}{\text{Peso fresco inicial}}$$

VARIABLES BIOQUÍMICAS

Cuantificación de clorofilas α y β : según la metodología propuesta por (Lichtenthaler (1987)). Este proceso consiste en extraer los pigmentos vegetales utilizando un solvente orgánico, como la acetona y luego medir la absorbancia de las soluciones extraídas a longitudes de onda específicas con un espectrofotómetro. En este experimento, se utilizaron 0.1 g de brotes frescos de vainilla in vitro, los cuales se pulverizaron con acetona y se midió la absorbancia a 645 nm para la clorofila α y a 661 nm para la clorofila β .

Cuantificación de fenoles: se usó la metodología de (Singleton y Rossi, 1965) con Folin-Ciocalteu. Este método indica que el reactivo Folin-Ciocalteu se reduce en presencia de compuestos fenólicos lo que genera un cambio en el color que puede ser cuantificado mediante espectrofotometría.

Para el experimento se utilizaron 0.1 g de muestra fresca, pulverizada con alcohol, a la que se le agregó Folin-Ciocalteu y carbonato de calcio (CaCO_3) hasta obtener color azul. La absorbancia se midió a 760 nm para determinar la concentración total de compuestos fenólicos y evaluar su capacidad antioxidante.

Cuantificación de carbohidratos: se utilizó la metodología de Whitman *et al.* (1971). Se pesó 1 g de hojas frescas y se trató con reactivo antrona en ácido sulfúrico para formar un compuesto verde, cuya absorbancia se midió a 660 nm.

Otra parte del estudio se trató en cuantificar la concentración de CO_2 al tiempo cero, el cual es el inicio del período de multiplicación y posteriormente se realizaron evaluaciones cada 15 días hasta el final del período. Se utilizó un monitor de CO_2 Telaire 2001 (Figura 1) que mide la temperatura y el CO_2 de forma simultánea en un lapso máximo de 30 s. Ambos tipos de biorreactores estuvieron en las mismas condiciones de incubación descritas anteriormente. Se aseguró que el aire acondicionado estuviera apagado y que no hubiera personas en el cuarto de incubación durante las lecturas.

Figura 1. Conexión de medidor telaire hacia el biorreactor por medio de una manguera de silicona.



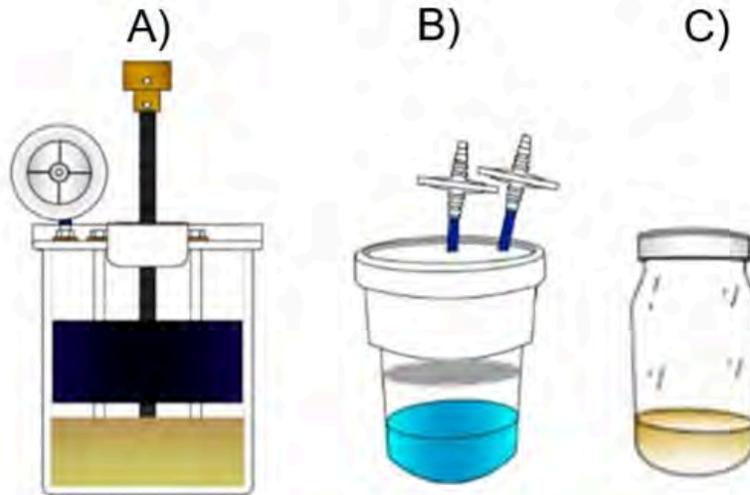
Se esperaron 10 min para estabilizar el medidor antes de registrar las lecturas. Luego, se tomaron mediciones cada minuto durante 2 h para observar el comportamiento del gas en los biorreactores.

Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar (DECA) considerando a un biorreactor como repetición (R) y un explante como unidad experimental (10XR), se utilizaron tres repeticiones por tratamiento (T) y los resultados fueron analizados utilizando el análisis de varianza ($p \leq 0.05$). La normalidad de los datos se determinó con una prueba Shapiro-Wilk.

En caso de existir diferencias significativas, se aplicó una prueba de comparación de medias de Tuckey ($p \leq 0.05$). Los datos fueron analizados por medio del paquete estadístico RStudio® para Windows. El experimento completo se repitió dos veces en el tiempo por medio de subcultivos sucesivos. En la Figura 2 se observan los distintos tratamientos evaluados.

Figura 2. Esquema de los biorreactores evaluados. A) biorreactor BSA; B) biorreactor tipo Rita[®] y C) testigo en SS.



Resultados y discusión

Número de brotes y hojas

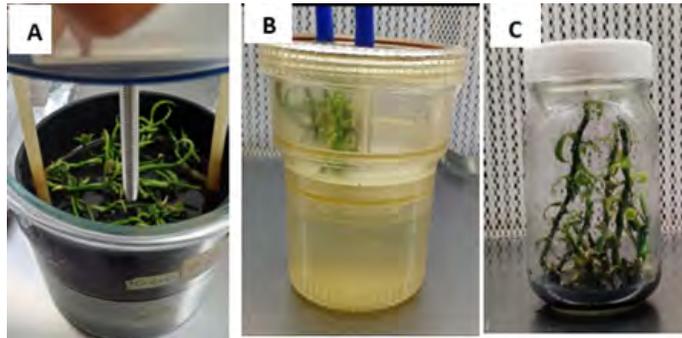
Se observó que los dos tratamientos resultaron estadísticamente diferentes al testigo, no hubo diferencias significativas entre ellos. En los sistemas de inmersión temporal, los explantes tienen contacto constante con nutrientes y reguladores en el medio líquido, mientras que en el medio semisólido solo los reciben de la base del explante (Etienne y Berthouly, 2002). Se aprecia que la frecuencia de inmersión fue igual en ambos tratamientos; sin embargo, hubo diferencias en el volumen total del recipiente entre ellos, el biorreactor Rita[®] tiene un volumen de 940 ml y se agregaron 350 ml de medio de cultivo (35 ml/explante), mientras que el biorreactor BSA su volumen total es de 1 700 ml y su volumen de medio agregado fue de 500 ml (36 ml/explante).

Estudios muestran que el volumen de medio por explante es crucial en la micropropagación en SIT. En banano (*Musa spp.*), se observó que 30 ml de medio por explante tuvo la mayor tasa de multiplicación (Roels *et al.*, 2005) en portainjertos de uva (*Vitis vinifera*) utilizando un biorreactor air-lift tipo globo, se duplicó la brotación al utilizar 65 ml de medio por explante en comparación con 25 ml con diferentes frecuencias de inyección de aire como son: 50, 100, 150 y 200 ml min⁻¹ (Jin *et al.*, 2013).

Este fenómeno puede deberse a la eliminación de componentes gaseosos como el dióxido de carbono y el etileno, en mayores volúmenes de aireación (Gao y Lee, 1992). En los biorreactores, la aireación influye en la transferencia de oxígeno, la turbulencia y la recirculación del medio (Wu *et al.*, 2018).

En la Figura 3 se muestran los brotes de vainilla multiplicados en los diferentes tratamientos (biorreactores y semisólido). Se aprecia que hubo variaciones en el crecimiento y desarrollo de hojas y tallos con diferentes grados de brotación.

Figura 3. Vista de tratamientos evaluados en la multiplicación *in vitro* de vainilla. A) biorreactor BSA; B) biorreactor Rita[®] y C) testigo SS.



Longitud de brotes

Se observó que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, la longitud varía entre 1.2 y 1.34 cm. Según Debabrata et al. (1997) la densidad de inoculación es un factor clave que influye en el crecimiento de los cultivos durante la micropropagación. Hahn y Paek (2005) encontraron que 80 nudos de crisantemo inoculados en biorreactores de columna de 10 L con volumen con 4 L de medio, fue la mejor densidad para el crecimiento y su multiplicación. Jin et al. (2013) mencionan que los resultados dependen del volumen del biorreactor; por ejemplo, en vid se demostró que la densidad del inóculo afectó la micropropagación, donde la densidad de inoculación de 50 y 65 explantes en un biorreactor tipo globo de 5 L, fueron óptimas para el crecimiento de las plántulas y mayor biomasa.

Cuantificación de clorofila α y β

Los resultados obtenidos demuestran que no existieron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los tipos de biorreactores, se observa que en cuanto a la cuantificación de clorofila α el tratamiento con biorreactor BSA con 0.09 mg g⁻¹ PF y el biorreactor Rita[®] con 0.07 mg g⁻¹ PF; sin embargo, estos fueron estadísticamente diferentes con el testigo (0.042 mg g⁻¹).

Para el caso de la cuantificación de la clorofila β los resultados observados indican que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos, incluyendo el testigo. Esto indica que en todos los tratamientos se presentaron las condiciones para el desarrollo de los brotes de vainilla durante la multiplicación *in vitro* a pesar de que los biorreactores utilizados tienen diferentes características.

Por otro lado, existen estudios donde se han utilizado biorreactores de inmersión temporal y se ha demostrado que hay diferencias en la cuantificación de clorofilas, por ejemplo, en ñame (Jova et al., 2011) o en manzano (Dewir et al., 2006) indicando que el aumento en los pigmentos fotosintéticos presentes en el biorreactor de elevación por aire tipo globo de 5 L y con 2 L de medio, pudo deberse a la cantidad de aire suministrado de forma externa y a la alta disponibilidad de los nutrientes (Roels et al., 2005).

El intercambio de gases probablemente provocó una mayor actividad fotosintética; por ejemplo, Aragón et al. (2005) demostraron que el SIT tiene una influencia positiva en el proceso de fotosíntesis durante la micropropagación de banano, en el caso de vainilla se reportó que hubo mayor contenido de clorofilas en el biorreactor de flujo y reflujo en comparación con el biorreactor de inmersión temporal (BIT[®]) y el Rita[®]. Por otro lado, Dewir et al. (2006) encontraron en manzano que los brotes cultivados en biorreactores de inmersión temporal mostraron un mayor contenido de clorofila α y β que los brotes cultivados en un sistema continuo.

Cuantificación de carbohidratos

En los dos sistemas evaluados (SIT) y semi sólido (SS) se proporcionó la misma cantidad de sacarosa al medio de cultivo (30 g L^{-1}); sin embargo, el contenido de carbohidratos en los brotes de vainilla, registrado al final del cultivo (30 días), fue mayor en los sistemas de inmersión temporal y significativamente diferente ($p \leq 0.05$) al testigo (SS).

En el Cuadro 2 se observan los resultados obtenidos en los diferentes tratamientos, donde se puede observar que no existe diferencias significativas entre los tratamientos de inmersión temporal (BSA y Rita[®]); sin embargo; si existe diferencia entre los biorreactores y el testigo, esto significa que la respuesta en los biorreactores con o sin inyección de aire sigue siendo más eficiente que el sistema semisólido (agar).

Cuadro 2. Evaluación de las variables morfológicas y bioquímicas del cultivo *in vitro* de vainilla (*Vanilla planifolia*) en dos tipos de biorreactores de inmersión temporal y el testigo en sistema semisólido.

Tratamiento	NB ¹	NH ²	LB ³ (cm)	IC ⁴	C α ⁵ (mg g ⁻¹ PF)	C β ⁶ (mg g ⁻¹ PF)	FT ⁷ (mg g ⁻¹ PF)	CH ⁸ (mg g ⁻¹ PF)
T1 BSA	23.66 ^a	2.9 ^a	1.3 ^a	5.816 ^b	0.09 ^{ab}	0.0338 ^a	0.0202 ^a	9.76 ^a
T2 Rita [®]	20.33 ^{ab}	2.6 ^a	1.34 ^a	8.566 ^a	0.0739 ^{ab}	0.0403 ^a	0.0119 ^a	10.384 ^a
T3 testigo SS	12 ^c	1.9 ^b	1.2 ^a	5.34 ^b	0.042 ^b	0.0289 ^a	0.0119 ^a	4.2031 ^b

Letras iguales dentro de columnas no hay diferencias estadísticas $p < 0.05$ de acuerdo con la prueba de Tukey. 1) número medio de brotes/ biorreactor; 2) número medio de hojas/explante; 3) longitud medio de brotes/ explante; 4) índice de crecimiento/ biorreactor; 5) contenido de clorofila α /biorreactor evaluado mediante la metodología de Lichtenthaler (1987); 6) contenido de clorofila β /biorreactor evaluado mediante la metodología de Lichtenthaler (1987); 7) contenido de fenoles totales/biorreactor evaluado mediante la metodología de Singleton y Rossi (1965) y 8) contenido de carbohidratos/biorreactor evaluado mediante la metodología de Whitman *et al.* (1971).

Aunque no hay muchos estudios acerca de la cuantificación de carbohidratos, hay registros donde se observó que las plántulas de piña asimilaron mejor los nutrientes, donde se obtuvieron 275 mg g^{-1} de carbohidratos a diferencia del cultivo convencional en sistema semisólido, donde se obtuvo un resultado de 16.8 mg g^{-1} (Escalona *et al.*, 2003).

En este estudio, no hubo diferencia significativa entre los diferentes biorreactores probados, incluso se observa que el contenido de carbohidratos fue muy similar entre el biorreactor Rita[®] ($10.384 \text{ mg g}^{-1} \text{ PF}$) y el biorreactor BSA ($9.76 \text{ mg g}^{-1} \text{ PF}$). Estos resultados sugieren que los sistemas de inmersión temporal, promueven que en los tejidos, se lleve a cabo mayor fotosíntesis, aunado a que en estos sistemas existe también mayor contenido de clorofilas y de acuerdo con Arencibia *et al.* (2013) quienes mencionan, que dado que la fotosíntesis es un proceso complejo en el que intervienen una serie de factores ambientales que determinan la asimilación del carbono, por lo que una concentración de CO_2 de 550 ppm por volumen de recipiente, podría ser óptimo para el mejor desarrollo de los tejidos cultivados *in vitro*.

El método de inyección de aire en los biorreactores tiene un impacto significativo en el crecimiento de las plantas. Según Trauger *et al.* (2022), en sus estudios realizados con cacao y ñame, demostraron que la inyección de aire con un 40% de oxígeno aumentó la respuesta de los brotes, comparado con aquellos cultivados sin aireación. Este método favorece una mejor oxigenación y un desarrollo de los brotes.

El sistema BSA mostró que, a pesar de no requerir la inyección de aire, este puede ser una opción efectiva. Como resultado de las lecturas de CO_2 (Cuadro 3) llevadas a cabo, se puede observar que en el biorreactor BSA hay en promedio una concentración de 404 ppm en comparación con la evaluación final, donde hay una concentración de 378 ppm.

Cuadro 3. Lecturas de CO₂ del Biorreactor RITA y biorreactor BSA.

RITA [®]	D0 (ppm) ¹	D15 (ppm) ²	D30 (ppm) ³	BSA	D0 (ppm) ¹	D15 (ppm) ²	D 30 (ppm) ³
Inicio lectura#	590	530	560	Inicio lectura#	402	468	360
Ajuste lectura#	533	500	520	Ajuste lectura#	359	346	364
Inicio inmersión#	892	800	900	Inicio inmersión#	340	351	282
Fin inmersión#	980	1001	987	Fin inmersión#	355	360	285
Tiempo de alta concentración (10 min) ⁸	930	900	945	Lectura estable#	426	408	378
Lectura estable ⁹	330	320	350				

1) concentración de CO₂ en ppm al día 0 de la multiplicación, promedio de seis inmersiones en 24 h; 2) concentración de CO₂ en ppm al día 15 de la multiplicación, promedio de seis inmersiones en 24 h; 3) concentración de CO₂ en ppm al día 30 de la multiplicación, promedio de seis inmersiones en 24 h; 4) lectura inicial al momento de conectar el medidor; 5) lectura estable después de 10 min de iniciado el proceso; 6) lectura al inicio de la inmersión; 7) lectura al final de la inmersión después de 2 min de inmersión; 8) concentración de CO₂ que se mantiene después de 10 min de la inyección de aire y 9) lectura al fina estable promedio de seis inmersiones en 24 h.

Esto indica que conforme avanza el tiempo, la concentración de CO₂ disminuye, esto puede deberse a un aumento de la cantidad de material vegetal que hay dentro del biorreactor, indicando que la concentración de CO₂ disminuye a medida que crecen los explantes, recordando que no hay inyección de aire directamente, pero si hay toma de aire a través del filtro de 0.2 µm que ayuda a su absorción continua, aunque en menor medida que en el Rita[®], donde hay inyección de aire a través del compresor.

En cambio, en el biorreactor Rita[®] la concentración promedio de CO₂ es mayor a la del biorreactor BSA. Se observó que en Rita[®], la inyección de aire provoca un aumento considerable en la concentración de CO₂.

Las lecturas por día comienzan con un promedio de 333 ppm. Aunque al final de cada ciclo, las estabilizaciones de las lecturas son más bajas que en el biorreactor BSA, es evidente que la inyección de aire contribuye a una mayor multiplicación de explantes, alcanzando un promedio de 870 ppm al inicio de la inyección y 989 ppm al final de cada inmersión, hasta que la concentración de CO₂ se estabiliza nuevamente dentro del biorreactor. Por otro lado, en el biorreactor BSA la concentración de CO₂ se mantiene relativamente estable durante la mayor parte del tiempo, incluso durante los períodos de inmersión.

Conclusiones

Se demuestra que existió una eficiencia similar entre los biorreactores Rita[®] y el biorreactor BSA durante la multiplicación *in vitro* de vainilla y ambos fueron superiores al testigo cultivado en agar. El biorreactor BSA mostró un potencial prometedor en la multiplicación de brotes. Es fundamental continuar con la optimización de este sistema mediante investigaciones adicionales basadas en los resultados obtenidos con el objetivo de acercarse cada vez más a los estándares establecidos por los biorreactores comerciales. Esto beneficiará tanto a la comunidad científica como a los productores al obtener plantas a un costo menor.

Las mediciones de CO₂ muestran que el intercambio gaseoso dentro de la atmósfera del biorreactor juega un papel crucial en el rendimiento. Se observa un aumento en la concentración de CO₂ en el biorreactor Rita[®] después de cada inyección, lo que podría representar una ventaja al actuar como una forma de fertilización con CO₂. Asimismo, se recomienda realizar más repeticiones de los experimentos realizados en este estudio para obtener resultados más sólidos y precisos.

Bibliografía

- 1 Aragón, C. E.; Escalona, M.; Capote, I.; Pina, D.; Cejas, I.; Rodríguez, R.; Jesús-Cañal, M.; Sandoval, J.; Roels, S.; Debergh, P. and González-Olmedo, J. 2005. Photosynthesis and carbon metabolism in plantain (*MusaAAB*) plantlets growing in temporary immersion bioreactors and during *in vitro* acclimatization. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 41(4):550-554. <https://doi.org/10.1079/IVP2005640>.
- 2 Arencibia, A. D.; Vergara, C.; Quiroz, K.; Carrasco, B.; Bravo, C. and Garcia-Gonzales, R. 2013. an approach for micropropagation of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) plants mediated by temporary immersion bioreactors (TIBs). *American Journal of Plant Sciences*. 4(5):1022-1028. <https://doi.org/10.4236/ajps.2013.45126>.
- 3 Debabrata, S.; Ramesh, C. and Prakash, S. N. 1997. Effect of inoculation density on potato micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 48(1):63-66.
- 4 Dewir, D. H.; Chakrabarty, D.; Hahn, D. and Paek, E. J. 2006. A simple method for masspropagation of *Spathiphyllum cannifolium* using an airlift bioreactor. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 42(3):291-297.
- 5 Escalona, M.; Lorenzo, J. C.; González, B.; Daquinta, M.; Gonzalez, J. L.; Desjardins, Y. and Borroto, C. G. 1999. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*. 18(9):743-748. <https://doi.org/10.1007/s002990050653>.
- 6 Escalona, M.; Samson, G.; Borroto, C. and Desjardins, Y. 2003. Physiology of effects of temporary immersion bioreactors on micro propagated pineapple plantlets. *In vitro Cellular & Developmental Biology Plant*. 39(6):651-656. <https://doi.org/10.1079/IVP2003473>.
- 7 Etienne, H. and Berthouly, M. 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 69:215-231.
- 8 Etienne, H.; Lartaud, M.; Michaux-Ferriere, N.; Carron, M. E.; Berthouly, M. and Teisson, A. 1997. Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Mt) II. Arg.) using the temporary immersion technique. *In vitro Cellular & Developmental Biology- Plant*. 33(2):81-87.
- 9 Gao, J. and Lee, J. M. 1992. Effect of oxygen supply on the suspension culture of genetically modified tobacco cells. *Biotechnology Progress*. 8(4):285-290. <https://doi.org/10.1021/bp00016a004>.
- 10 Georgiev, V.; Schumann, A.; Pavlov, A. and Bley, T. 2014. Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in Life Sciences*. 14(6):607-621. <https://doi.org/10.1002/elsc.201300166>.
- 11 Hahn, E. J. and Paek, K. Y. 2005. Multiplication of *Chrysanthemum* shoots in bioreactors as affected by culture method and inoculation density of single node stems. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 81(3):301-306. <https://doi.org/10.1007/s11240-004-6655-0>.
- 12 Jin, M. Y.; Piao, X. C.; Xiu, J. R.; Park, S. Y. and Lian, M. L. 2013. Micropropagation using a bioreactor system and subsequent acclimatization of grape rootstock '5BB'. *Scientia Horticulturae*. 164:35-40. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.09.004>.
- 13 Jova, M. C.; Kosky, R. G. and Cuellar, E. E. 2011. Effect of liquid media culture systems on yam plant growth (*Dioscorea alata* L. Pacala Duclos). *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*. 15(4):515-521.
- 14 Lichtenthaler, H. K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *In: Lester Packer and Roland Douce. Methods in Enzymology, Plant Cell Membranes*. 148:350-382. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1).
- 15 Lotfi, M. and Werbrouck, S. P. O. 2020. SETIS™, a novel variant within the temporary immersion bioreactors. *Acta Horticulturae*. 30(1285):253-258. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2020.1285.37>.

- 16 Murashige, T. and Skoog, F. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15(3):473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- 17 Robert, M. L.; Herrera-Herrera, J. L.; Herrera-Herrera, G.; Herrera-Alamillo, M. Á. and Fuentes-Carrillo, P. 2006. A new temporary immersion bioreactor system for micropropagation. *In: Loyola-Vargas, V. M. and Vázquez-Flota, F. Methods in Molecular Biology*. 318(2):121-130. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-959-1:121>.
- 18 Roels, S.; Escalona, M.; Cejas, I.; Noceda, C.; Rodriguez, R.; Canal, M. J.; Sandoval, J. and Debergh, P. 2005. Optimization of plantain (*Musa AAB*) micropropagation by temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 82(1):57-66. <https://doi.org/10.1007/s11240-004-6746-y>.
- 19 Singleton, V. L. and Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 82(1):57-66. <https://doi.org/10.1007/s11240-004-6746-y>.
- 20 Trauger, M.; Hile, A.; Sreenivas, K.; Shouse, E. M.; Bhatt, J.; Lai, T.; Mohandass, R.; Tripathi, L.; Ogden, A. J. and Curtis, W. R. 2022. CO₂ supplementation eliminates sugar-rich media requirement for plant propagation using a simple inexpensive temporary immersion photobioreactor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 150(1):57-71. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02210-3>.
- 21 Whitman, F. H.; Blaydes, D. F. and Devlin, R. M. 1971. *Experiments in plant physiology*. Monograph Wageningen University, Ed. Van Nostrand Reinhold. New York. 245 p.
- 22 Wu, H. C.; Kuo, M. L. and Chen, C. M. 2018. Promotion of vegetative growth in force-ventilated *Protea Cynaroides* L. explants cultured in modified temporary immersion culture vessels. *HortScience*. 53(2):231-235. <https://doi.org/10.21273/hortsci12513-17>.



Evaluación de biorreactores con y sin inyección de aire para la micropropagación de *Vanilla planifolia* G. Jackson

Journal Information
Journal ID (publisher-id): remexca
Title: Revista mexicana de ciencias agrícolas
Abbreviated Title: Rev. Mex. Cienc. Agríc
ISSN (print): 2007-0934
Publisher: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Article/Issue Information
Date received: 01 June 2025
Date accepted: 01 August 2025
Publication date: 07 October 2025
Publication date: Aug-Sep 2025
Volume: 16
Issue: 6
Electronic Location Identifier: e3804
DOI: 10.29312/remexca.v16i6.3804

Categories

Subject: Artículo

Palabras clave:

Palabras clave:

micropropagación

mecánico

medios líquidos

Rita®

vainilla

Counts

Figures: 3

Tables: 3

Equations: 2

References: 22

Pages: 0