

LA INGENIERIA ELECTRÓNICA AL SERVICIO DE LAS PLANTAS



“DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE BIOAMBIENTES ARTIFICIALES CONTROLADOS PARA EL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES IN VITRO”

¹Javier Escobar, ²-José Alberto Hernández, ³Javier Enrique Cortés

¹ Instrumentista Industrial, Profesor Laboratorios Gimnasio Campestre

² Licenciado en Electromecánica, Ingeniero mecánico, profesor física Gimnasio Campestre

³Licenciado en Biología, Magíster en Microbiología, Profesor Ciencias Naturales Gimnasio Campestre

Recibido: 16 de abril de 2008

Aprobado: 3 de junio de 2008

RESUMEN

La biotecnología es una ciencia que permite la interdisciplinariedad y la transdisciplinariedad dentro del trabajo pedagógico — investigativo en donde se toman los seres vivos o sus productos para satisfacer las necesidades de los seres humanos o para mejorar los recursos o el ambiente que el hombre ha alterado. De esta manera nuestro equipo de trabajo propone una alternativa, en la que no sólo aplicamos los conceptos biológicos a una especie vegetal en particular, sino aplicamos la tecnología para recuperar o minimizar el impacto del hombre sobre especies críticamente amenazadas.

Para este fin es necesario controlar las variables externas que inducen el crecimiento y la proliferación de las plantas en cautiverio, es así que se construyeron las BAC — Bioambientes Controlados que permiten analizar las variables que rodean a una planta; La temperatura, la cual involucra la transferencia de energía, El fotoperiodo y la intensidad de luz que aumenta los periodos de producción de biomasa y la humedad, variable controlada por la cantidad de agua contenida en los medios, esta nos permite conservar el potencial de evapotranspiración del explante en el cultivo in-vitro.

Palabras clave: Cultivo “in Vitro”, cámaras de cultivo, circuito electrónico.

SUMMARY

Biotechnology is a science that allows interdisciplinary and cross disciplines in the pedagogy and research work where the living organisms and their products are taken to meet the human needs or to improve the environment that man has altered. In this way our research crew proposes an alternative in which we do not just apply biological concepts to a particular plant species, but we do also apply technology to recover or to minimize the impact of man over species critically threatened.

For this purpose, we must monitor certain external variables; which may produce growth and proliferation in plants. The BAC (Bio Controlled Environments) analyzes stimulus of environment such as temperature which involves the transfer of power, photoperiod, light intensity that increases periods of biomass production and moisture (variable controlled by the amount of water contained in the medium) that allows us to retain the potential evapotranspiration in the cultivation of explants “*in vitro*”.

Keywords: Cultivation in vitro, growth chambers, electronic circuit.

MARCO TEÓRICO

La Biotecnología y los cultivos “in Vitro”

En los últimos tiempos, la biotecnología ha propuesto técnicas que permiten lograr mejores plántulas en forma acelerada, al mismo tiempo la propagación clonal (micropropagación) de especies que eran difíciles de micropropagar por métodos comunes (estacas, acodos, injertos, etc.) (Severin et al, 2003), (Villalobos, 1991).

La micropropagación, o la propagación clonal por técnicas in vitro constituyen una de las posibilidades biotecnológicas con mayores logros en el desarrollo de una nueva agricultura.

Una ventaja que nos proporciona la micropagación en comparación con la agricultura tradicional se muestran en el crecimiento en espacios reducidos que permiten la producción de centenares de plántulas (Severin et al, 2003).

La posibilidad para la propagación vegetativa puede ser pensada como una potencialidad fundamental de las plantas debida a la totipotencia celular. El cultivo «*in vitro*» de órganos y tejidos promueve la activación de la mitosis celular, induce la desdiferenciación celular y permite la propagación, logrando utilizar diversos tipos células, órganos y tejidos de gran número de especies (Villalobos, 1991), (Pierik, 1990).

Cuando se establece un cultivo a partir de un explante tienen lugar procesos de regeneración y morfogénesis que desencadenan en el establecimiento de una nueva planta.

Las potencialidades de los cultivos «*in vitro*» de tejidos aislados son obvias en la propagación de vegetales. Además, el uso de las técnicas de cultivo «*in vitro*» resulta esencial para la mejora genética y biotecnológica de plantas.

En la propagación «*in vitro*», además de las condiciones de asepsia, es importante resaltar el control de los factores físicos del medio: humedad, luz y temperatura. Para desarrollar esta técnica es importante diseñar cámaras de crecimiento de plantas, en las que se puede controlar estos factores. Las cámaras

deben estar totalmente separadas, de manera que no sean influenciadas por los factores físicos presentes en el medio externo, y el fotoperiodo es manipulado por la acción de tubos fluorescentes. Los citados parámetros están controlados desde un cuadro de mandos situados en el exterior (Severin et al, 2003), (Villalobos, 1991).

El cultivo de tejidos consiste esencialmente en aislar una porción de la planta (explante) y obtener así células, tejidos, órganos, que se cultivan en condiciones asépticas, en un medio de cultivo de composición química definida, y que se colocan en condiciones ambientales controladas de luz, fotoperiodo, temperatura y humedad, adecuadas a la fisiología de la planta.

Cámara de crecimiento

Una cámara de crecimiento es un dispositivo de vidrio, plástico o madera en la que se cultivan plantas, a una temperatura diferente a la exterior.

En la jardinería antigua española, el invernadero se llamaba estufa fría. La cual aprovecha el efecto producido por la radiación solar que, al atravesar un vidrio u otro material traslúcido, calienta los objetos que hay detrás; estos, a su vez, emiten radiación con una longitud de onda mayor que la solar. El cristal usado para un invernadero trabaja como medio selectivo de la transmisión para diversas frecuencias espectrales, y su efecto es atrapar energía dentro de la cámara, que calienta el ambiente interior. Esto puede ser demostrado abriendo una ventana pequeña cerca de su parte superior. La temperatura cae considerablemente. Este principio es la base del sistema de enfriamiento automático auto ventilación.

En ausencia de un recubrimiento el calor absorbido se eliminaría por corrientes convectivas y por la emisión de radiación infrarroja (longitud de onda superior a la visible). La presencia de los cristales impide el transporte del calor acumulado hacia el exterior por convección y obstruye la salida de una parte de la radiación infrarroja. El efecto neto es el de acumulación de calor y aumento de temperaturas del recinto (<http://www.tienda-ejemplo.com/epages/tienda-ejemplo.sf/es ES>)

Un invernadero solar funciona dejando pasar la radiación solar y atrapando la energía de esa radiación

para aumentar y mantener la temperatura interna sobre la del exterior. Las BAC tienen la característica de permitir las variaciones de luz (fotoperiodo), para estimular fuertemente el crecimiento de la planta, de la humedad dándole una mayor estabilidad y la temperatura que es una variable esencial para la multiplicación de la células. El diseño original de estas cámaras permite la adaptación de microambientes para diferentes especies de plantas.

Variables físicas controlables

Temperatura

Es un parámetro termodinámica que caracteriza el estado de un sistema teniendo en cuenta la presencia de calor, o transferencia de energía. El incremento en la temperatura logra estimular en las plantas su crecimiento.

Foto período

Los efectos del foto período en las plantas son habitualmente intensos. Las respuestas a la duración diaria de la luz de diversos fenómenos del crecimiento y desarrollo (germinación, estolonización, bulbación, elongación de tallos, floración, etc.) están ya claramente establecidas; sin embargo, estas respuestas son complejas y en la mayoría de los casos están *asociadas* a otros factores ambientales, como la temperatura, o propios de la planta, como su estado de desarrollo. Desde el punto de vista de la producción, en la mayoría de las hortalizas la respuesta foto periódica más importante es la floración, ya sea para la obtención del producto hortícola o para la producción de las semillas de la especie (T. Zamudio, 2005).

Intensidad de luz

Cantidad de energía emitida bien por una fuente de luz natural (ej. el sol) o bien por una artificial que en nuestra cámara de crecimiento colabora con el proceso de fotosíntesis de las plantas y así garantizar que el proceso sea el adecuado.

Cuando se tienen ambientes controlados es de suma importancia que los valores de temperatura interior, luminosidad y humedad permanezcan constantes o *por lo menos* dentro de unos rangos permisibles.

El control de la luminosidad se puede realizar de varias maneras, la primera consiste en la elaboración de un

circuito con un sensor foto lumínico que permite cuantificar la luz dentro del ambiente mediante un decodificador digital, la segunda es conociendo el valor de la potencia o intensidad de los bombillos que se utilicen dentro del recinto junto con la altura o distancia de los mismos a las plantas u organismos que se encuentren al interior, esta luminosidad se puede variar mediante la utilización de un circuito sencillo acoplado con un potenciómetro el cual regula el paso de corriente que llega a los bombillos.

La importancia de controlar la temperatura dentro de una cámara de crecimiento se debe a que, en el caso de las plantas cualquier variación de esta afecta directamente el desarrollo de la misma, por esta razón se deben conocer varios términos relativos a la temperatura. Se define como temperatura óptima aquel valor que permite la mayor tasa de crecimiento, los valores en el que se registran crecimientos se denominan rangos de tolerancia y para aquellos valores en los cuales no se registra crecimiento se conocen como límites de tolerancia o temperaturas críticas, en estos valores las plantas pueden tener daños irreversibles o incluso morir. Los valores estándar de temperatura dentro de una cámara de crecimiento dependen del tipo de organismo que se encuentre dentro de ella y pueden variar de acuerdo con el desarrollo en el que se encuentren, para el caso de una planta su temperatura crítica es más alta si se encuentra en estado vegetativo a la que tendría en estado de adormecimiento.

Para el control de la temperatura dentro de una cámara de crecimiento lo mejor es la utilización de un termómetro y un termostato programable. Este sistema consiste en un termómetro que permite visualizar el valor de la temperatura, gracias a un sensor térmico que se coloca dentro del ambiente a controlar. El sensor se conecta a un circuito controlador que permite observar en los displays (visualizadores digitales) el valor actual de la temperatura.

Los circuitos electrónicos funcionan por lo general con un 5 voltios, por lo cual es necesario la utilización de un montaje electrónico que permita la conexión de estos a una fuente de 120 voltios, estos montajes se conocen como rectificadores o reguladores de voltaje y permiten obtener voltajes entre 5 y 12 voltios. El consumo nominal de corriente es inferior a los 400 mA.

BAC

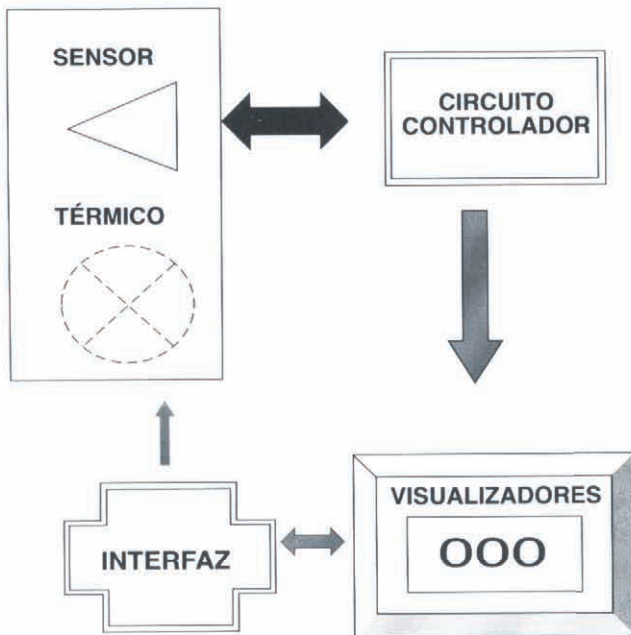


Figura 1. Diagrama de bloques para un sistema controlador de temperatura.

La metodología utilizada es la embriogénesis somática, que consiste en el desarrollo de embriones a partir de células somáticas (no reproductoras). En este proceso se dan etapas semejantes a las de la reproducción sexual. Los embriones somáticos son, no obstante, entidades independientes y semejantes a los digóticos. Por esto, la regeneración de plantas a través de dicho proceso es el mecanismo idóneo para cualquier tipo de investigación y de aplicación biotecnológica tales como los experimentos de transformación genética o el aislamiento de protoplastos. Inicialmente, se procede a la inducción de callos o proliferaciones celulares indiferenciadas, constituidos por células totipotentes (proembriones somáticos). Se originan luego los embriones somáticos. Estos se colocan luego, en medios de cultivo que permitan la regeneración de plantas. Las plántulas regeneradas son posteriormente climatizadas a condiciones *ex vitro*, y luego, transferidas a condiciones de invernadero, para completar su desarrollo. (Severin, 2003), (Serrano, 1991).

MATERIALES Y MÉTODOS

ESTUDIO DE MATERIALES Y CARACTERÍSTICAS DE LOS BIOAMBIENTES — BAC.

El material seleccionado para la elaboración de las BAC fue el Madeflex, que es una lámina formada por partículas de madera, aglomeradas mediante la adición de resinas especiales de termofraguado y la aplicación de procesos de alta presión y temperatura. Algunas de las características de esta madera son: resistencia a altas temperaturas, bajo costo y la facilidad de manipulación.



Figura 2. Adecuación de los materiales de fabricación de la BAC

DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE LOS BIOAMBIENTES - BAC

Las paredes internas de la incubadora fueron pintadas con pintura de aceite de color blanco con la finalidad de reflejar la luz. Se instalaron dos lámparas de luz blanca, en el piso una de 40w y en el techo una de 60 w con el fin de iluminar toda la bandeja de crecimiento y mantener la temperatura en un rango de 20 a 30 grados centígrados. Se elaboró una bandeja de policarbonato transparente, la cual se ubicó a la mitad de la altura total de la BAC y es la que sirve como soporte a los frascos de crecimiento. Se pintó el exterior con pintura de agua y selladas las uniones con colbón madera para evitar la pérdida de temperatura.

Diseño de los sistemas de control

Para el control de la intensidad lumínica se utilizaron bombillas de 40 y 60 w de luz blanca lo cual permite un promedio de 55 lumens, para el foto periodo se utilizó un temporizador o timer con un rango de 12 horas de activación y 12 horas desactivado. La humedad se asume constante dado que los frascos están tapados y las BAC están selladas lo cual garantiza unos parámetros de humedad dentro del rango normal el cual también se controla con los sistemas de recirculación de aire.

El control de temperatura es un poco más complicado ya que el sistema debe medir la temperatura real dentro de la BAC y a su vez tener un circuito que active el sistema de enfriamiento en el momento que la temperatura suba del rango establecido.

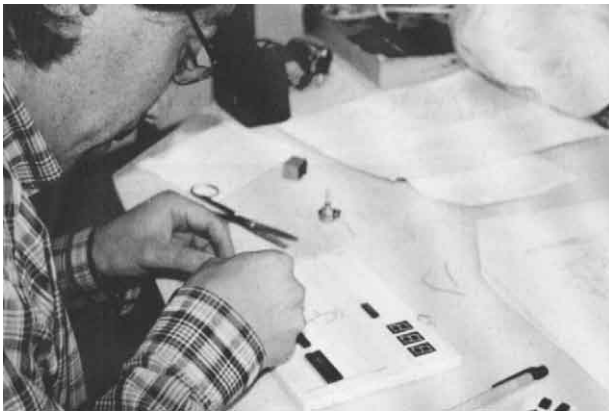


Figura 3. Prediseño del circuito controlador de temperatura

Inicialmente se consultó sobre sensores de temperatura analógicos y se seleccionaron 2 tipos de sensores los cuales eran de fácil aplicación. Estos sensores fueron:

Termistor eléctrico: conocido también como resistencia variable dependiente de la temperatura, este termistor sensa la temperatura dentro de la BAC y genera una señal de bajo voltaje, el cual es amplificado y comparado con un voltaje inicial. Si la temperatura aumenta en el sensor se enciende un led rojo (L1) indicando este suceso, y si la temperatura desciende se enciende un led amarillo (L2). Este sistema se conoce como un termómetro por comparación.

A continuación se esquematiza el circuito utilizado y su funcionamiento.

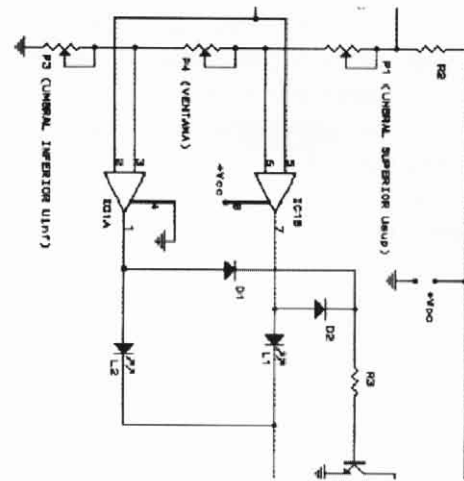


Figura 4. Diagrama electrónico utilizado en la BAC 1

El circuito integrado que se utilizó fue el LM358, el cual es un amplificador operacional doble y de uso común, algunas de sus características operacionales son:

Voltaje	5 Vcc
Corriente	1.2 mA
Corriente Max.	60mA
Temperatura de operación	0°C—70°C
Disipación de potencia	500 Mw

Tabla 1. Rango de operaciones del amplificador LM 358

Este circuito amplificador funciona comparando los voltajes de entrada provenientes del sensor y un voltaje preestablecido por las resistencias de control. El funcionamiento de este sistema es bastante sencillo, una vez alimentado con 9 V se esperan varios minutos mientras que el sensor adopta la temperatura interna de la BAC, luego con los potenciómetros P1, P3 y P4 se establecen los valores de voltaje de control y con P4 se estabilizan los voltajes de entrada. El circuito comienza a funcionar cuando el led 3 (bombillo verde) se enciende y la diferencia de voltaje entre los pines 3 y 6 del amplificador es de ± 200 mV esto se controla con P1 y P3. De igual forma a la salida del L3 se adiciona un amplificador de corriente, para la activación del sistema de ventilación, el cual entra en

funcionamiento cuando Li (bombillo rojo) se encienda esto indicará que la temperatura interna de la BAC aumentó. Cuando la temperatura nuevamente disminuya hasta el valor preestablecido el sistema de ventilación se desactivará y el Li se apagará encendiéndose nuevamente el L3. Dado que dentro de la BAC se estarán gestando procesos térmicos es de esperar que la temperatura no descienda del valor base preestablecido.

Este sistema como se dijo anteriormente permite el control de la temperatura, pero no da el valor de la temperatura interna de la BAC. El circuito hace parte de la BAC 1.

LM 35: este sensor térmico es utilizado en circuitos acoplados a conversores analógico/digitales y permite sensar la temperatura de una manera muy precisa y trasladar este dato a un sistema de visualización como puede ser una pantalla LCD o un display.

El LM 35 opera entre 0-99 °C y entrega un voltaje en milivoltios que es directamente proporcional al valor de la temperatura sensada. Este sistema un poco más complejo en su desarrollo necesita de un controlador programable, una memoria programable, un sistema amplificador, una pantalla LCD y un decodificador de 7 segmentos si el sistema de visualización es en displays.

El voltaje entregado por el sensor es amplificado utilizando para esto nuevamente el amplificador operacional LM358. La señal amplificada llega al microcontrolador y a la memoria donde se compara con valores preestablecidos. Luego la señal es enviada a la pantalla LCD en el cual se lee el valor de la temperatura sensada.

A continuación se esquematiza el circuito utilizado para este sensor y se explica su funcionamiento.

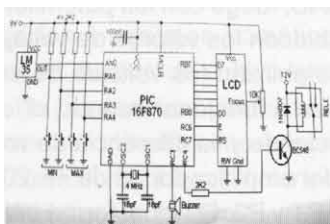


Figura 5. Diagrama electrónico utilizado en la BAC 2

El microcontrolador en este caso un PIC16F870 debe ser programado antes de conectarse al sistema, para esto se consultó sobre programación y se utilizó un programa base para conversión análogo/digital y lectura de datos, de igual forma la memoria interna del PIC también se debe programar para que sea compatible, esta guarda los valores con los que operará el sistema, de tal forma que cuando la temperatura llegue a un máximo se activará el relé del ventilador bajando la temperatura. De igual forma que en el circuito anterior es de esperarse que la temperatura no descienda del valor base mínimo preestablecido.

Los valores máximos y mínimos del sistema se obtienen mediante los pulsadores Pi, P2, P3, P4 y se visualizan en la pantalla LCD.

El circuito se alimenta con 12 Vcc y el consumo de corriente máximo es de 300 mA.

RESULTADOS

Figura 6. Construcción de las bases de las BAC



Se eligió trabajar con el madeflex, que por su constitución permite la conservación de la temperatura, es de fácil manipulación y no presenta flexibilidad a los movimientos. Cada incubadora fue diseñada para mantener 30 frascos de vidrio de 100 ml de volumen total, a lo cual se le puede añadir 30 ml de medio de cultivo necesarios para tres semanas de crecimiento.



Figura 7. Impermeabilización y pintura BAC2

Se selló cada hendidura con colbón y masilla para evitar fugas de calor, el interior se pintó con pintura de aceite de color blanco, que nos permite conservar la temperatura, la humedad y nos refleja la luz en todas las direcciones, puntos necesarios para mantener en condiciones similares a todas las plántulas.

Cada unión de las partes de la estructura debía corresponder estrechamente, ya que con el uso de poca energía se debía mantener la temperatura del ambiente.

El circuito controlador de temperatura por comparación se armó en una baquelita universal de 12×12 cm y se ubicó en la parte superior izquierda de la BAC 1. La calibración de este circuito se realizó con un termómetro ambiental de 0°C a 100°C el cual tuvo una fluctuación de 25°C a 28°C , siendo la menor temperatura en las horas de la noche y la máxima al medio día. Los datos fueron correlacionados con un termómetro de máximos y mínimos.

Adicionalmente se tuvo en cuenta para la calibración, la temperatura a la que habitualmente se encuentra la especie vegetal (*Pasiflora adulterina*), esta temperatura puede ser variada según sea la especie de estudio. El fotoperiodo, es determinado según sea la necesidad por una toma para 110 Vcc.

La humedad es constante y depende del medio de cultivo. El sistema de calefacción y el sistema de ventilación se instalaron en la parte inferior central de la misma y se activaron en su momento gracias al relé del circuito controlador.

Las pruebas de temperatura se hicieron con dos termómetros ambientales, uno de temperatura fija para estandarizar la temperatura deseada y el otro de máximos y mínimos para observar los rangos de fluctuación de la misma. De igual forma el circuito electrónico implementado garantizó una temperatura constante de 27°C dentro de la BAC activando en su momento el sistema de ventilación.

CONCLUSIONES

Se elaboraron 3 BAC, las cuales tienen una capacidad de 30 frascos cada una, cada frasco contiene 30ml del medio de cultivo y un volumen total de 100ml.

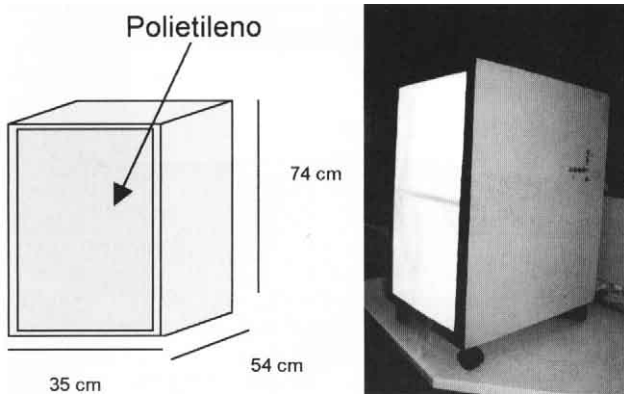


Figura 8. Dimensiones de la BAC.

El área total interna de cada BAC es de 0.131 m^3 , el volumen de cada medio de cultivo es de 0.000117 m^3 para un total de 0.0035 m^3 .

La iluminación que llega a los medios de cultivo es de 65 lumens en la parte superior y 45 lumens en la parte inferior para un promedio de 55 lumens sobre el medio de cultivo.

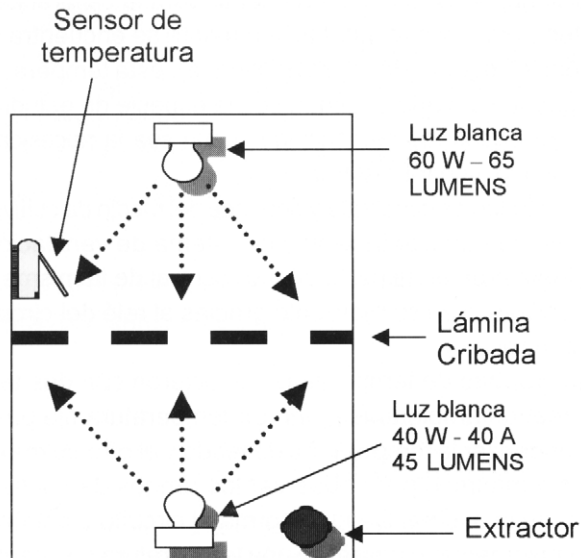


Figura 9. Diseño del interior de la BAC

Se desarrollaron 2 circuitos eléctricos, el primero un circuito controlador de temperatura por comparación ubicado en la BAC 1, este permite mantener la temperatura entre valores de 220C y 290C lo cual garantiza las condiciones de los explantes. En la BAC 2 y BAC 3 se utilizó un circuito eléctrico que además de controlar los sistemas de ventilación y calefacción nos indica el valor de la temperatura real dentro de la BAC en todo momento.

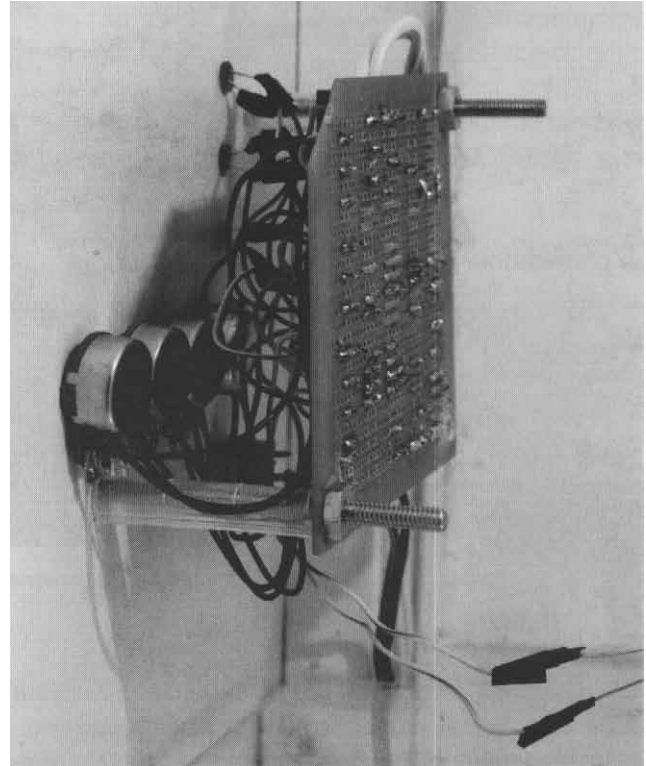


Figura 10. Circuito eléctrico por comparación BAC1

Los 2 circuitos desarrollados tienen la posibilidad de graduarse a diferentes temperaturas con lo cual se podrían desarrollar diferentes tipos de especies vegetales.

-La temperatura de las BAC se ve afectada por: la temperatura ambiente de la sala donde se sitúa, el calor generado por las fuentes de luz de que dispone y el calor generado por los circuitos electrónicos.

El control de la temperatura a la que se desarrolla el cultivo "in Vitro" se efectúa mediante un sistema de refrigeración-calefacción controlado a través de un circuito termo-sensible conectado a un extractor. El sistema de refrigeración-calefacción debe estar

correctamente dimensionado a fin de conseguir que la temperatura de la zona de cultivo se mantenga dentro de los límites deseados.

Se caracterizaron las condiciones de funcionamiento respecto de la temperatura de las cámaras de cultivo teniendo en cuenta:

La homogeneidad de temperatura: es decir la variación de la temperatura en diferentes zonas de la cámara, se logró mediante la recirculación de aire dentro de la cámara, utilizando para esto un extractor de aire conectado a una fuente de 12 Vcc.

La estabilidad de la temperatura: es decir, una medida de la variación de la temperatura de las BAC a lo largo del tiempo.

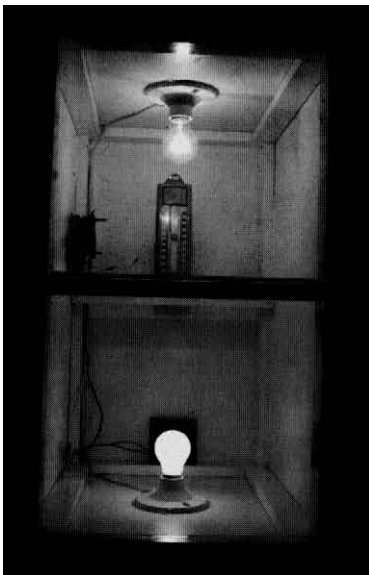


Figura 11. Estandarización de las variables de trabajo

Esta temperatura se caracterizó en 26°C.

Todas las cámaras disponen de un programador que permite regular la temperatura a la que está la cámara en cada momento.

La temperatura a la que está expuesto el explanto cultivado “*in Vitro*” afecta a la mayoría de procesos fisiológicos y por consiguiente es un factor fundamental a controlar.

En general, cada especie tiene un intervalo de temperaturas en el que se produce el crecimiento óptimo. Este intervalo puede variar en función del genotipo, del

órgano del que se ha obtenido el explanto, de la época del año, de la edad de la planta madre, del fotoperiodo, etc. Una complicación adicional se produce por el hecho de que puede existir interacción entre la temperatura óptima de crecimiento y otros factores como la luz, la composición del medio (en algunos casos se ha comprobado que se obtiene mayor rendimiento haciendo fluctuar la temperatura según el fotoperiodo).

BIBLIOGRAFÍA

1. Biblioteca Luis Ángel Arango Fondo FEN de Colombia, 2006, Las Flores de la Pasión, Banco de la Republica, www.lablaa.org, Bogotá, Colombia.
2. Instituto Alexander Von Humboldt, 2005, Lista Roja de Plantas Fanerógamas de Colombia, Programa de Biología de la Conservación, Proyecto Flora Amenazada, Bogotá, Colombia.
3. Severin, C.; Salinas, A.; Gattuso, S.; Gattuso, M.; Busilacchi, H.; Giubileo, G. y Aguirre, A. 2003a In vitro seed germination of *Passiflora caerulea*. *Journal of Tropical Medicinal Plants* 4(1): 97-102.
4. Villalobos, A.; Torpe, T. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. Pp. 127-141. En: *Cultivo de tejidos en la Argentina. Fundamentos y Aplicaciones*. Roca, W y Mroginski, L. (eds.). CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical).
5. Pierik R.L.M., Ayerbe Mateo-Sagasta L “Cultivo *in Vitro* de Plantas Superiores”, 1990.
6. Serrano M., Piñol Sierra M.T “Biotecnología Vegetal”. Editorial Síntesis, 1991.
7. Lindsey K., Jones M. “Biotecnología Vegetal Agrícola”. Editorial Acribia, Zaragoza, 1989.
8. Otahola V., 2000, Regeneración de plantas de *Pachita (passiflora edulis f. Flavicarpa)* A partir del cultivo *in Vitro* de discos de hojas, *Biagro*, 12(3):71—74 Venezuela.
9. Appezzato B., et al, 1999, Anatomical Studies of *in Vitro* organogenesis induced in leaf—derived explants of passion fruit, *Pesq. Agropec.*, Brasilia, V 34, n1 1, págs. 2007—2013.
10. Biasi L.A., et al, 2000, Organogenesis from international segments of yellow passion fruit, *Scientia Agricola*, V 57, o 4, p⁶⁶¹.665.
11. <http://www.jmarcano.com/nociones/minimo2.html>
12. <http://www.plaquetodo.com/catalogo/libro 22>
13. <http://www.pablin.com.ar/electron/circuito/mc/termost/index.htm>
14. <http://www.elergonomista.com/fisiologiavegetal/crecimiento.htm>
15. <http://www.tienda-ejemplo.com/epages/tienda-ejemplo.sf/es...ES/?ObjectPath=/Shops/testejemplo/Categories/%22Informaci%C3%B3n%20de%20Inter%C3%A9s%22/Invernaderos>
16. Zamudio T., 2005, Centro de origen de plantas cultivadas <http://www.prodiversitas.bioetica.org/nota63-3.htm>
16. Usategui J., Et si. 2005, Introducción a la robótica, Editoria Thonson, Madrid, España