



Establecimiento de un protocolo para el aislamiento y purificación de protoplastos a partir de hoja *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* Linnaeus) variedad Biloxi.

Vallejo Sandoval, Laura Elizabeth

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Jadán Guerrero, Mónica Beatriz, PhD.

9 de septiembre del 2021

URKUND



Document Information

Analyzed document	TESIS_LAURA_VALLEJO_urkund.docx (D111762123)
Submitted	8/27/2021 8:50:00 PM
Submitted by	
Submitter email	biblioteca@espe.edu.ec
Similarity	4%
Analysis address	ilbbioteca.GDC@analysis.urkund.com

Sources included in the report

SA	Documento para urkund_Vargas_Kathya.docx Document Documento para urkund_Vargas_Kathya.docx (D97384228)	 5
SA	Grupo Difusión Científica / Urkund- JENNIFER TORRES.docx Document Urkund- JENNIFER TORRES.docx (D29569925) Submitted by: biblioteca@espe.edu.ec Receiver: altoapanta1.GDC@analysis.urkund.com	 2
SA	Metodología de producción in vitro.docx Document Metodología de producción in vitro.docx (D65155793)	 1
W	URL: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php%3Fscript%3Dsci_arttext%26pid%3DS0377-94242015000100001 Fetched: 8/27/2021 4:51:06 AM	 1
SA	Eryngium Tesis terminada.docx Document Eryngium Tesis terminada.docx (D90398853)	 2
W	URL: https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/22640/1/JESSICA%20ALEJANDRA%20GUARTANZA%20LOJA.pdf Fetched: 7/29/2020 4:36:35 AM	 2
W	URL: http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos_Ciat/biblioteca/Cultivo_de_tejidos_en_la_agricultura.pdf Fetched: 8/27/2021 8:51:00 PM	 1



MONICA BEATRIZ
JADAN GUERRERO



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “**Establecimiento de un protocolo para el aislamiento y purificación de protoplastos a partir de hoja *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* Linnaeus) variedad Biloxi**” fue realizado por la señorita **Vallejo Sandoval, Laura Elizabeth** el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 25 de agosto del 2021



Firmado electrónicamente por:
**MONICA BEATRIZ
JADAN GUERRERO**

.....
Mónica Beatriz Jadán Guerrero, PhD.
DIRECTORA
C.C.: 1802278562



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Vallejo Sandoval, Laura Elizabeth**, con cédula de ciudadanía n° 172113895-4, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Establecimiento de un protocolo para el aislamiento y purificación de protoplastos a partir de hoja *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* Linnaeus) variedad Biloxi”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 25 de agosto del 2021

.....

Laura Elizabeth Vallejo Sandoval
C.C.: 172113895-4



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo, **Vallejo Sandoval, Laura Elizabeth**, con cédula de ciudadanía n° 172113895-4, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Establecimiento de un protocolo para el aislamiento y purificación de protoplastos a partir de hoja *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* Linnaeus) variedad Biloxi”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 25 de agosto del 2021.

.....
Laura Elizabeth Vallejo Sandoval
C.C.: 172113895-4

DEDICATORIA

A mamá Juanita[†] con gran amor, tu recuerdo me devuelve el aliento.

Laura Vallejo

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Elisa y Berthti y abuelito Victor, por su apoyo a lo largo de toda mi vida, por sus consejos en el momento indicado y por su infinito amor. Ustedes son el mejor ejemplo a seguir.

A Nicole, mi hermana y amiga de la vida, que con cada palabrita de apoyo, amor y comprensión me ha llenado de coraje para conseguir mis objetivos.

A mi directora de tesis, Mónica Jadán PhD., por su paciencia y gran dedicación para guiar este proyecto a pesar de las duras circunstancias de la pandemia. Gracias por acogerme en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, por compartir su experiencia y conocimientos sobre protoplastos y por ser una persona con gran calidad humana.

A Andrea y mis compañeros tesisistas del laboratorio por los bonitos momentos compartidos. Especialmente a Francisco por acompañarme y darme valor cuando tuve que trasnochar haciendo ensayos.

A Yasmincito, por ser y estar, en la felicidad y en la tristeza. Gracias amiga.

INDICE DE CONTENIDOS

URKUND.....	2
CERTIFICACIÓN	3
RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA	4
AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN	5
DEDICATORIA	6
AGRADECIMIENTOS	7
INDICE DE CONTENIDOS	8
ÍNDICE DE TABLAS.....	12
ÍNDICE DE FIGURAS	14
RESUMEN.	15
ABSTRACT.....	16
LISTADO DE ABREVIATURAS	17
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	18
Antecedentes	18
Justificación	19
Objetivos.....	20
Objetivo general	20

Objetivos específicos.....	21
CAPÍTULO 2: MARCO REFERENCIAL.....	22
Género <i>Vaccinium</i> L.	22
Generalidades.....	22
Arándano o blueberry (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.)	23
Clasificación taxonómica	23
Origen y distribución.....	23
Características morfológicas.....	24
Propiedades nutritivas y medicinales.....	25
Cultivares	26
Cultivo de tejidos vegetales in vitro	27
Aspectos generales	27
Medio de cultivo.....	28
Reguladores de crecimiento	29
Desinfección del material vegetal	30
Establecimiento de brotes.....	30
Protoplastos vegetales	31
Aspectos generales	31

	10
Aplicaciones.....	31
Aislamiento de protoplastos a partir de hoja	32
Purificación de protoplastos	33
Cultivo de protoplastos	34
Hipótesis.....	34
CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS	35
Localización geográfica del ensayo	35
Obtención de plantas madre	35
Tratamiento fitosanitario	35
Condiciones generales de esterilización y cultivo in vitro.....	36
Desinfección de explantes.....	37
Inducción y multiplicación de brotes in vitro.....	39
Obtención de protoplastos a partir de hojas in vitro de arándano (Vaccinium corymbosum L.)	40
Revisión bibliográfica de protocolos de aislamiento de protoplastos de arándano (Vaccinium corymbosum L.)	43
Revisión bibliográfica sobre protocolos de purificación de protoplastos de arándano (Vaccinium corymbosum L.)	44
Revisión bibliográfica sobre protocolos de cultivo de protoplastos de arándano (Vaccinium corymbosum L.)	45

CAPÍTULO 4: RESULTADOS.....	47
Desinfección de explantes.....	47
Aislamiento de protoplastos	52
Resultados de los tratamientos enzimáticos para el aislamiento de protoplastos de arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.)	52
Datos obtenidos de la revisión bibliográfica.....	56
Purificación de protoplastos en base a análisis bibliográfico.....	60
Cultivo de protoplastos en base a análisis bibliográfico	61
CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN.....	63
Desinfección de explantes.....	63
Aislamiento de protoplastos	66
Purificación de protoplastos.....	68
Cultivo de protoplastos	69
CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES.....	71
CAPÍTULO 7: RECOMENDACIONES	72
Capítulo 8: BIBLIOGRAFÍA.....	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Clasificación taxonómica de Vaccinium corymbosum L.</i>	23
Tabla 2. <i>Valor nutricional del arándano (Vaccinium corymbosum L.)</i>	25
Tabla 3. <i>Tratamientos de desinfección con Skul-27®</i>	38
Tabla 4. <i>Componentes del medio BH3 0.7M</i>	40
Tabla 5. <i>Tratamientos planteados para el aislamiento de protoplastos</i>	42
Tabla 6. <i>Composición de la solución CPW sacarosa o manitol</i>	45
Tabla 7. <i>Datos obtenidos de los tratamientos de desinfección, respecto a contaminación fúngica, contaminación bacteriana y oxidación, evaluados a los 7 y 14 días de siembra.</i>	48
Tabla 8. <i>Análisis estadístico realizado a los resultados obtenidos en los tratamientos de desinfección.</i>	51
Tabla 9. <i>Análisis de varianza no paramétrica de Kruskal Wallis para las variables contaminación fúngica y bacteriana.</i>	51
Tabla 10. <i>Análisis de varianza no paramétrica de Kruskal Wallis para la variable oxidación.</i>	52
Tabla 11. <i>Resultados de la cantidad de protoplastos promedio de arándano (n=3).</i>	54
Tabla 12. <i>Análisis de varianza de los tratamientos de aislamiento de protoplastos</i>	55
Tabla 13. <i>Prueba de Tukey para los tratamientos de aislamiento de protoplastos</i>	56
Tabla 14. <i>Artículos científicos revisados para el análisis de técnicas de aislamiento de protoplastos.</i>	58

Tabla 15. <i>Resumen de las técnicas de aislamiento de protoplastos de los estudios analizados ..</i>	59
Tabla 16. <i>Resultados de rendimiento y porcentaje de viabilidad de los protoplastos aislados en los artículos científicos seleccionados</i>	60
Tabla 17. <i>Condiciones de centrifugado aplicadas a los estudios analizados.....</i>	61
Tabla 18. <i>Condiciones de cultivo de protoplastos.....</i>	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Planta de arándano en las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE</i>	36
Figura 2. <i>Preparación de medios de cultivo</i>	37
Figura 3. <i>Explantos de arándano establecidos in vitro para el aislamiento de protoplastos</i>	41
Figura 4. <i>Hojas de arándano trituradas y mezcladas con la solución enzimática y el medio BH3, en un matraz Erlenmeyer</i>	42
Figura 5. <i>Explantos de segmentos nodales de arándano observados a los 14 días de la siembra</i>	47
Figura 6. <i>Porcentaje de explantes contaminados por hongos y bacterias</i>	49
Figura 7. <i>Porcentaje de explantes oxidados</i>	50
Figura 8. <i>Protoplastos de hojas in vitro de arándano observados con un aumento de 100x</i>	53
Figura 9. <i>Curvas de concentración promedio (n=3) de protoplastos de arándano aislados, tratados durante 34 horas</i>	55
Figura 10. <i>Países con investigaciones sobre el aislamiento de protoplastos de especies del orden de los Ericales y especies arbustivas de interés</i>	57

RESUMEN

El arándano (*Vaccinium corymbosum* Linnaeus) es un arbusto frutal con un gran contenido de antioxidantes, en los últimos años se ha posicionado como un cultivo de interés económico para el país. Sin embargo, la producción nacional solo cubre la demanda interna, por tanto, es importante desarrollar investigaciones que contribuyan al incremento del rendimiento productivo de esta baya. El aislamiento y cultivo de protoplastos es un enfoque que puede ser utilizado para producir híbridos de alta producción, resistentes a enfermedades y adaptados a las condiciones ambientales del Ecuador. En primer lugar, se estandarizó un protocolo para la desinfección de los explantes que consistió en detergente al 2%, etanol al 70%, 4mL/L de SKUL-27® e hipoclorito de sodio al 3%, obteniendo valores de contaminación menores al 10% y oxidación menor al 8%. Además, se estableció un protocolo para el aislamiento de protoplastos aplicando una solución enzimática con 1% de celulasa, 1.5% de macerozima y 0.3% de pectinasa a un tiempo de incubación de 28 horas, dando como resultado 5.95×10^4 protoplastos por peso fresco de material vegetal. Finalmente, se realizó un análisis bibliográfico de investigaciones anteriores sobre las condiciones de purificación y cultivo de protoplastos; los trabajos escogidos fueron del orden de los Ericales y otras especies frutales y leñosas con valor económica.

Palabras clave:

- **ARÁNDANO**
- **PROTOPLASTOS**
- **AISLAMIENTO**
- **PURIFICACIÓN**

ABSTRACT

The blueberry (*Vaccinium corymbosum* Linnaeus) is a fruit shrub with a high content of antioxidants, in recent years it has positioned itself as a crop of economic interest for the country. However, national production only covers internal demand, therefore, it is important to develop research that contributes to increasing the productive yield of this berry. The isolation and culture of protoplasts is an approach that can be used to produce hybrids of high production, disease resistance, and adapted to the environmental conditions of Ecuador. First, a protocol for disinfection of the explants was standardized that consisted of 2% detergent, 70% ethanol, 4mL/L of SKUL-27[®], and 3% sodium hypochlorite, obtaining contamination values lower than 10% and oxidation less than 8%. In addition, a protocol was established for the isolation of protoplasts by applying an enzymatic solution with 1% cellulase, 1.5% macerozyme, and 0.3% pectinase at an incubation time of 28 hours, resulting in 5.95x10⁴ protoplasts per fresh weight of vegetal material. Finally, a bibliographic analysis of previous research on the purification and culture conditions of protoplasts was achieved; the chosen scientific articles were from the Ericales family and other woody species with economic value.

Keywords:

- **BLUEBERRY**
- **PROTOPLASTS**
- **ISOLATION**
- **PURIFICATION**

LISTADO DE ABREVIATURAS

% P/V: Porcentaje en peso sobre volumen.

% V/V: Porcentaje en volumen sobre volumen.

2iP: 2-isopenteniladenina.

g: gramos.

L: litros.

WPM: Woody Plant Medium.

m. s. n. m.: metros sobre el nivel del mar.

µm: micrómetros.

rpm: revoluciones por minuto.

Pp: protoplastos.

gFW: gramo de peso fresco.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

Antecedentes

El fruto del arándano (*Vaccinium corymbosum* Linnaeus) es altamente consumido a nivel mundial, debido a que ha despertado interés por sus cualidades nutricionales y sus características organolépticas agradables (Anticono et al., 2016). Estas bayas son una fuente rica de antioxidantes como antocianinas, flavonoides y flavonoles asociados a la eliminación de radicales libres (Veberic et al., 2015), así como compuestos fenólicos y ácidos orgánicos con actividad antimicrobiana como ácido benzoico y antocianinas (Jiménez-Bonilla & Abdelnour-Esquivel, 2018).

Estados Unidos, el principal consumidor, productor, importador y exportador de arándano en el mundo, tiene un mercado con un número de consumidores mayor a 275 millones, con un consumo per cápita de aproximadamente 260 gramos del fruto fresco por año (Baldomero et al., 2017). En 2017, junto con Canadá abarcaron el 58% de la producción global, seguido por Sudamérica con el 26% y Europa con el 10% (Romo et al., 2019). Respecto a Sudamérica, Chile y Perú son los productores más grandes de la región, siendo Perú el principal exportador con 72583 toneladas en 2018, lo que generó ingresos en el país por 548104 millones de dólares (Martin & Senador, 2019).

A nivel nacional, la actividad productiva se inició en el año 2015 con plantas de la variedad Biloxi traídas desde Estados Unidos y su comercialización se enfoca al consumo interno (Egas, 2018), las áreas de cultivo están distribuidas en varias provincias, encontrándose plantaciones en Azuay, Tungurahua, Chimborazo, Pichincha, Cotopaxi, Imbabura y Carchi (Egas,

2018; El Herald, 2020). Sin embargo, gracias a las características climáticas de la sierra ecuatoriana que favorecen cosechas constantes durante todo el año, se espera que próximamente la producción alcance niveles de exportación (Chávez, 2019). Para ello es importante mejorar esta especie, consiguiendo variedades con resistencia a plagas y enfermedades y que se adapten a los suelos del Ecuador.

Los protoplastos representan un sistema unicelular y son útiles para realizar estudios fisiológicos y bioquímicos, además de ser aplicados en programas de mejoramiento genético de especies de interés (Sahab et al., 2019). Estos se obtienen por digestión enzimática de la pared celular, de modo que la membrana de la célula queda expuesta convirtiendo al protoplasto en un objetivo para hibridación o fusión somática con el fin de generar nuevas combinaciones (Abomohra et al., 2016). Por ello, con el presente proyecto se pretende aportar al mejoramiento del cultivo de arándano en el país, empleando técnicas de cultivo *in vitro* y una revisión bibliográfica exhaustiva para la obtención de protoplastos a partir de mesófilo.

Justificación

En el Ecuador, el arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) es un fruto no tradicional que ha tenido una creciente demanda a partir del año 2015 y se ha establecido como un cultivo altamente rentable con un buen retorno de la inversión a largo plazo (Chávez, 2019). Si bien las condiciones para su crecimiento y desarrollo en el territorio ecuatoriano se continúan clarificando, existen características ambientales que ofrecen una gran oportunidad para su cultivo, como una temperatura cálida en el día y fría en la noche, así como una alta incidencia de

radiación solar UV que contribuye a la producción de azúcares en el fruto, mejorando sus características organolépticas (Cortés et al., 2016).

El arándano se considera una especie arbustiva resistente, de rápido crecimiento y gran rendimiento productivo. No obstante, pueden presentarse varias plagas y enfermedades que alteran su desarrollo normal, disminuyen su ciclo de producción e influyen en la cantidad y calidad de la cosecha (Becerra et al., 2017). Las plagas del arándano incluyen insectos succionadores como *Pseudococcus viburni*, *Hemiberlesia rapax* y *Saissetia coffeae*, además pulgones (*Aphis gossypi*), escarabajos (*Pantomorus cervinus*) y cuncunillas (*Copitarsia decolora*) (Defrancesco et al., 2018).

Una estrategia con gran potencial para la obtención de plantas con resistencia a plagas y enfermedades es la obtención de cíbridos e híbridos somáticos mediante fusión de protoplastos de diferentes variedades o especies. De acuerdo con Davey et al. (2010), los protoplastos vegetales proporcionan el material base para la realización de experimentos que permiten mejorar genéticamente las plantas, un ejemplo es el método de hibridación somática que combina células somáticas de diferentes especies, dando como resultado la generación de un nuevo germoplasma que sirva como fuente de plantas novedosas con características deseadas para diferentes tipos de cruces (Grosser et al., 2010).

Objetivos

Objetivo general

Establecer un protocolo para el aislamiento y purificación de protoplastos de hoja *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) variedad Biloxi.

Objetivos específicos

Inducir la formación de brotes de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) *in vitro* a partir de segmentos nodales.

Estandarizar un protocolo para el aislamiento de protoplastos de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) a partir de hojas utilizando técnicas de cultivo *in vitro* y análisis bibliográfico.

Analizar los protocolos para la purificación de protoplastos de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) *in vitro*, con base en la revisión bibliográfica.

CAPÍTULO 2: MARCO REFERENCIAL

Género *Vaccinium* L.

Generalidades

Las plantas del género *Vaccinium* L. pertenecen a la familia de las Ericáceas y consta de aproximadamente 450 especies que se distribuyen ampliamente a lo largo del hemisferio norte y en las montañas de Asia tropical y América central y del sur, incluso algunas especies endémicas fueron encontradas en África y Madagascar (Hurkova et al., 2019; Song & Hancock, 2011). Sus frutos son bayas de semillas numerosas conocidas como ‘berries’ y presentan un alto contenido de polifenoles que influyen en el color, astringencia y la duración de las frutas frescas (Liu et al., 2019).

Las especies más distribuidas del género son los frutos denominados cranberries (*Vaccinium macrocarpon*), lingonberries (*Vaccinium vitis-idaea*) y arándanos (*Vaccinium corymbosum* L. y *Vaccinium myrtillus*), estas bayas son apetecidas debido a su actividad antioxidante, cardioprotectora, antimicrobiana y su potencial para la prevención del cáncer (Pervin et al., 2013). También se las ha utilizado en medicina tradicional para evitar el desarrollo de la diabetes, fibrosis, obesidad y enfermedades autoinmunes (Pires et al., 2020).

Los arándanos son el cultivo más popular del género *Vaccinium* L. y los arándanos comerciales se subclasifican en tres tipos: highbush (*V. corymbosum* L.), rabbiteye (*V. ashei*) y lowbush (*V. angustifolium* y *V. myrtilloides*). Estas especies son arbustos de copa y comúnmente alcanzan una altura de 1,8 a 2,5 metros (Shi et al., 2007).

Arándano o blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.)

Clasificación taxonómica

Inicialmente *Vaccinium corymbosum* L., fue descrito por Linneo en 1753 con material vegetal colectado en Norteamérica. Sin embargo, la clasificación final de la especie fue expuesta por Kloet en 1980. En la Tabla 1 se describe la taxonomía del arándano.

Tabla 1.

Clasificación taxonómica de Vaccinium corymbosum L.

Categoría	Taxón
Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Superdivisión	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Dilleniidae
Orden	Ericales
Familia	Ericaceae
Género	<i>Vaccinium</i> Linnaeus
Especie	<i>Vaccinium corymbosum</i> Linnaeus

Nota. Datos tomados de (Kloet, 1980; USDA, 2020)

Origen y distribución

El arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) es una especie originaria del este de América del Norte, crecía principalmente en Estados Unidos en los estados de Nueva Jersey, Michigan, Illinois, Indiana e inclusive Quebec en Canadá (Rubio et al., 2018). Durante cientos de años estos frutos fueron cosechados de las plantas silvestres por indígenas americanos, quienes los utilizaban para el tratamiento de enfermedades basándose en los saberes ancestrales transmitidos de generación en generación (Ballington, 2001; Moerman, 1998).

A inicios del siglo XIX se comenzaron a domesticar algunas variedades de arándano alto o 'highbush' (*V. corymbosum* L.), las plantas fueron trasplantadas en campos ubicados en Florida y Nueva Inglaterra (Kole, 2011). Posteriormente en 1990, el arándano alto se cultivaba en 10 países, más adelante la popularidad del fruto se incrementó gracias a sus cualidades nutricionales y para el año 2011 fueron 27 los países que lograron su cultivo comercial, principalmente en zonas templadas (Michalska & Łysiak, 2015).

En la actualidad, se considera prácticamente cosmopolita ya que su área de cultivo se ha expandido ampliamente gracias al mejoramiento de cultivares, teniendo mayor resistencia al estrés radiactivo y siendo necesarias menos horas de frío para acoplarse a regiones más cálidas (Retamales & Hancock, 2018). Los cultivares de arándano alto representan más del 80% de los cultivos, seguida por el arándano ojo de conejo o 'rabbideye' (*V. ashei*) con un porcentaje aproximado del 14% (Becerra et al., 2017).

Características morfológicas

Son arbustos longevos pequeños que llegan a medir de 20 a 40 centímetros de altura, aunque existen variedades con mayor altura. Los tallos crecen desde la base con ramas abundantes, las hojas son simples y alternas, tienen forma ovalada con bordes aserrados y presentan pecíolos pequeños. Las flores tienen la corola blanca y se sitúan en racimos axilares o terminales (Baldomero et al., 2017; Gordó, 2011; Rubio et al., 2018).

Su sistema radical se caracteriza por tener un aspecto fibroso, las raíces se distribuyen por la superficie del suelo a 50 centímetros de profundidad, son largas, finas y muy ramificadas (Gordó, 2011; Rebolledo, 2013). Su fruto mide de 1 a 3 centímetros de diámetro y alberga varias

semillas en su interior, se caracteriza por ser de color azul en la madurez. La epidermis del fruto está cubierta por una capa cerosa fina que juega el rol de proteger contra factores externos como insectos o bacterias (Michalska & Łysiak, 2015; Rubio et al., 2018).

Propiedades nutritivas y medicinales

Los arándanos (*Vaccinium corymbosum* L.) son considerados alimentos de calidad debido a sus características nutricionales como su bajo valor calórico, alto contenido de fibra y son fuente de vitamina C, hierro, potasio y calcio (Jiménez & Abdelnour, 2013). Las características nutricionales del fruto se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2.

Valor nutricional del arándano (Vaccinium corymbosum L.)

Componente	Cantidad en 100 g
Carbohidratos	14,49 g
Fibra	2,4 g
Proteína	0,74 g
Vitamina C	9,7 mg
Potasio	77 mg
Fósforo	12 mg
Calcio	6 mg
β-Caroteno	32 µg

Nota. Tomado de (U.S. Department of Agriculture, 2021)

Además, estas bayas también tienen una gran cantidad de fitonutrientes como resveratrol, antocianinas, taninos y otros compuestos fenólicos con alta actividad antioxidante, cuyo consumo está relacionado con la prevención de enfermedades crónicas como el cáncer y problemas cardíacos (Lyons et al., 2003; Yang et al., 2001).

Cultivares

De acuerdo con Retamales & Hancock (2018), los cultivares del arándano alto o 'highbush' se clasifican en:

- "Northern highbush": variedades que han sido mejoradas buscando un mayor rendimiento en zonas de bajas temperaturas, tienen un mayor requerimiento de horas frío. Ejemplos: Bluetta, Elliot, Jersey, Berkeley, Duke.
- "Southern highbush": variedades que se han mejorado para adaptarse a zonas templadas y climas más tropicales, requieren menos horas frío. Ejemplos: Biloxi, Misty, Jewel, Emerald, Star.

Variedad Biloxi

La variedad Biloxi es una planta de producción temprana que presenta un crecimiento erecto y denso, es muy vigorosa y productiva. Sus bayas tienen un tamaño mediano, color azul vibrante y un alto nivel de grados "Brix", cualidad que incide en un dulce sabor (Baldomero et al., 2017). Requiere al menos 400 horas de frío, con una temperatura mínima de 7°C, óptima de 16°C a 20°C y máxima de 30°C (Retamales & Hancock, 2018).

Fue desarrollada por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) en los estados de Maryland y Misisipi, con la idea de conseguir una variedad que resista las condiciones climáticas del sur de su país y extender su cultivo comercial. Se realizaron cruces entre varias especies del género *Vaccinium*: *V. corymbosum* L., *V. angustifolium*, *V. ashei* y *V.*

darrowii, para otorgarle un menor requerimiento de horas de frío. Se lanzó para la producción en 1998 en el sureste de Estados Unidos (San Martín, 2013; Spiers et al., 2002).

A partir del año 2015, los productores ecuatorianos incursionaron en el cultivo de arándano, teniendo mayor aceptación la variedad Biloxi, gracias a su adaptabilidad al clima y suelo de la región y también por su alto rendimiento productivo (Egas, 2018). Adicionalmente en 2021, se inició la ejecución de un proyecto para producir arándanos en la provincia de Tungurahua, para ello se sembraron 660 plantas de la variedad Biloxi y Emerald (La Hora, 2021).

Cultivo de tejidos vegetales *in vitro*

Aspectos generales

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es un conjunto de técnicas que utiliza células, tejidos u órganos de plantas con el fin de micropropagar o regenerar plantas enteras garantizando la asepsia, bajo condiciones nutricionales y ambientales controladas (Iliev et al., 2010). Entre estas condiciones se incluyen: componentes del medio de cultivo (nutrientes, reguladores de crecimiento, agentes gelificantes), pH, temperatura ambiental, humedad y luminosidad (Coleman et al., 2003).

Esta técnica se fundamenta en el principio de totipotencia de las células vegetales, que se refiere a la capacidad de las células para dividirse en células diferenciadas que pueden regenerar un tejido o una planta completa bajo condiciones de cultivo controladas (Sharry et al., 2020).

Representa un sistema experimental ampliamente utilizado para estudios de genética vegetal, mecanismos de reguladores de crecimiento y procesos fisiológicos y bioquímicos implícitos en el desarrollo de las plantas (Suarez, 2020). Asimismo, tiene varias aplicaciones prácticas en la agricultura con la clonación de plantas élite, en fitoquímica industrial con la obtención de biomoléculas de alto valor empleando biorreactores y en ingeniería genética con la transformación de especies de interés (Neumann et al., 2020).

Medio de cultivo

El medio de cultivo es vital para el cultivo *in vitro* de tejidos ya que provee la matriz de soporte físico para que pueda desarrollarse el explante, manteniendo un contacto directo con los nutrientes del medio y facilitando el intercambio gaseoso (Coleman et al., 2003). Los componentes del medio de cultivo reflejan los requerimientos de la planta y generalmente están constituidos por: nutrimentos minerales (micro y macronutrientes), compuestos orgánicos, reguladores de crecimiento y agente gelificante (Suarez, 2020). Un medio de cultivo óptimo debe ser formulado en base al conocimiento profundo del material vegetal de interés.

Hoy en día existen varias formulaciones basales para los medios de cultivo, entre las más utilizadas están: el medio de Murashige y Skoog (MS), el medio B5 de Gamborg, el medio para plantas leñosas (WPM) y el medio para plantas leñosas de Driver y Kuniyuki (DKW). Cada formulación tiene aplicaciones para promover diferentes respuestas en el desarrollo de la planta (Phillips & Garda, 2019). Estos sistemas suelen mantenerse bajo condiciones estériles, de lo contrario la proliferación de microorganismos en el medio de cultivo puede causar la pérdida del material vegetal cultivado (Neumann et al., 2020).

Reguladores de crecimiento

La adición de fitohormonas o reguladores de crecimiento en el medio de cultivo permite favorecer los procesos inmersos en el desarrollo de las plantas, como el crecimiento de brotes o raíces, la germinación, la aparición de callo o la producción de ciertos metabolitos secundarios (Sharry et al., 2020). Por lo general, los explantes tienen la capacidad de producir las cantidades suficientes de fitohormonas para sus procesos, lo que se hace necesario complementar con fuentes externas (Suarez, 2020). De acuerdo a su función, los reguladores de crecimiento se clasifican en auxinas, citoquininas, giberelinas, brasinoesteroides, el ácido abscísico y el etileno.

Citoquininas

Estos reguladores de crecimiento son derivados de la adenina y se encargan de interrumpir la dominancia apical, retrasar la senescencia de hojas, frenar el envejecimiento celular y actuar junto con las auxinas en el control de los procesos de crecimiento y desarrollo de la planta (Coleman et al., 2003). En estado natural, la planta tiene la capacidad de producir zeatina (ZEA) y 2-isopentenil adenina (2iP). Además, comercialmente se pueden encontrar citoquininas sintetizadas químicamente como la 6-benciladenina (6-BAP), la kinetina (KIN) y el tidiazuron (TDZ) (Sharry et al., 2020).

6-bencilaminopurina (6-BAP)

Es un regulador de crecimiento sintético, tiene más potencia que las citoquininas naturales endógenas y en el cultivo de tejidos *in vitro* es el compuesto más ampliamente utilizado ya que favorece la organogénesis y la multiplicación de meristemas (Suarez, 2020). Esta

fitohormona fue sintetizada por primera vez por el fisiólogo vegetal Folke Skoog en la década de 1950, quién evaluó su papel en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Amasino, 2005).

Desinfección del material vegetal

La desinfección de los explantes antes del cultivo *in vitro* es un paso primordial para eliminar los contaminantes presentes en la superficie, como bacterias y esporas de hongos, pero se debe evitar causar daños en el tejido (Iliev et al., 2010). Los desinfectantes utilizados incluyen hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio, cloruro benzalconio, peróxido de hidrógeno, cloruro de mercurio y etanol (Sharry et al., 2020).

No es posible generalizar sobre el uso de un tipo de desinfectante y su concentración, ya que es diferente para cada especie y cada tipo de tejido, por ello se debe experimentar con diferentes protocolos en base a un análisis bibliográfico, usando un número de explantes reducido (Abdelnour & Escalant, 2004).

Establecimiento de brotes

El balance auxina-citoquinina juega un rol importante para la proliferación de brotes, ya que las altas concentraciones de citoquininas en el explante favorecen la interrupción de la dominancia apical e incrementan la tasa de proliferación de yemas axilares (Suarez, 2020).

En el caso del cultivo *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.), estudios previos han identificado los reguladores de crecimiento y su concentración para obtener los mejores resultados en la inducción de brotes. De acuerdo con Abdelnour & Jiménez (2016), la adición de citoquininas en bajas concentraciones al medio de cultivo induce una mayor tasa de formación

de brotes y un aumento en la cantidad de las hojas. Diferentes estudios recomiendan el uso de 6-BAP, 2iP y zeatina en diferentes concentraciones (Brenes et al., 2015; A. Castro, 2016; Gómez & Esquivel, 2013).

Protoplastos vegetales

Aspectos generales

Los protoplastos se definen como células vegetales desnudas a las que se les ha retirado la pared celular por técnicas mecánicas o enzimáticas y están rodeados únicamente por la membrana plasmática (Szabados, 1991). Estas células son totipotentes, por tanto, tienen la capacidad de regenerar la pared celular, crecer y multiplicarse, pudiendo ser cultivadas para dar origen a miles de células, tejidos y órganos, hasta regenerar una planta en condiciones óptimas (Chakraborty, 2016).

Los protoplastos se pueden obtener a partir de plantas cultivadas *in vitro* o *ex vitro*, el material vegetal inicial puede ser muy variado incluyendo: raíz, hoja, cladodios, tallo, frutos, coleóptilos, microsporas, tubos polínicos e incluso callo y suspensiones celulares (Gamborg, 2002). Sin embargo, se ha demostrado que el mesófilo foliar de plantas establecidas *in vitro* tiene un mejor rendimiento a la hora de obtener protoplastos viables (Ortega et al., 2017).

Aplicaciones

El cultivo de protoplastos no es útil para la micropropagación de plantas debido a su baja eficiencia y la variación somaclonal de las plantas regeneradas, esto ocurre porque se necesitan procesos de organogénesis indirecta o embriogénesis indirecta, pasos que involucran un alto riesgo de variación genética (Suarez, 2020). Sin embargo, proporcionan el material

experimental de partida para realizar investigaciones de carácter genético, fisiológico, biofísico y bioquímico (Davey et al., 2010).

La fusión de protoplastos permite la unión de células de especies vegetales diferentes por hibridación somática o cibrización, facilitando procedimientos de transformación genética que no serían posibles con células intactas (Coleman et al., 2003). Con este proceso se logra que los genomas se combinen evitando las limitaciones de incompatibilidad sexual naturales para producir híbridos somáticos (Aoyagi, 2011).

También se han utilizado los protoplastos para determinar cuáles son los genes reguladores asociados a la producción de metabolitos secundarios. Asimismo, pueden ser útiles para la obtención de ciertos fitoquímicos, ya que en ausencia de la pared celular estos se liberan fácilmente en el medio de cultivo, brindando un aumento en la productividad y facilitando la purificación del producto en pasos posteriores (Saranya et al., 2020).

En el área de la fitopatología, el uso de protoplastos ha contribuido al estudio de la etiología de los virus, esclareciendo los procesos infectivos y de replicación dentro de la célula. Además, se han realizado investigaciones sobre el comportamiento y especificidad de hongos y bacterias patógenas y se ha logrado la obtención de nuevas variedades con resistencia a enfermedades (Ortega et al., 2017).

Aislamiento de protoplastos a partir de hoja

Durante el aislamiento de protoplastos es importante considerar factores como la concentración de las enzimas y el tiempo de incubación necesario para disolver la pared celular

sin llegar a explotar las células. Además, la edad fisiológica del material vegetal afecta el rendimiento y la viabilidad de los protoplastos aislados, por ello se recomienda utilizar hojas jóvenes que presenten una lámina foliar expandida (Szabados, 1991). Por otro lado, el uso de material vegetal establecido *in vitro* ofrece una clara ventaja ya que se encuentra libre de contaminación y los parámetros ambientales se pueden controlar (Power & Davey, 1990).

La pared celular vegetal se compone principalmente de celulosa, hemicelulosa y pectinas. De acuerdo con estos componentes, la eliminación de la pared se puede dar con una solución enzimática que contenga celulasa (aislada a partir de *Trichoderma reesei* y *T. viride*) que digiere las capas de celulosa y hemicelulosa y pectinasa (aislada de *Rhizopus ssp*) que degrada la pectina (Suarez, 2020).

Purificación de protoplastos

La purificación de protoplastos un proceso en el cual se separan los protoplastos de las enzimas para evitar la degradación de los mismos y se filtran los restos de tejido vegetal que lograron ser digeridos y se suspenden en un medio de cultivo líquido con reguladores de presión osmótica (Coleman et al., 2003).

La purificación involucra el paso de la solución digerida a través de una malla metálica con un tamaño de poro adecuado para evitar la fuga de protoplastos y remover únicamente el material vegetal sin digerir y luego se centrifuga el líquido resultante para separar el pellet. Los protoplastos contenidos allí son trasladados a una nueva solución con el mismo potencial osmótico que la solución enzimática (Liu, 2005). Por último, se cuantifica la cantidad de

protoplastos purificados por mililitro de solución, observando en el microscopio con la ayuda de un hemocitómetro.

Cultivo de protoplastos

Existen múltiples medios de cultivo para el cultivo de protoplastos, de acuerdo a las necesidades nutricionales que se requieran. El objetivo de esta fase es inducir la regeneración de la pared celular y promover la mitosis para generar microcallo (Davey et al., 2010).

El éxito del cultivo de protoplastos depende de la composición del medio de cultivo, ya que los protoplastos aislados son frágiles y susceptibles a cualquier variación osmótica. Mantener una adecuada presión osmótica en el medio puede prevenir la lisis o plasmólisis, esta se ajusta mediante la adición de azúcares (sacarosa, fructosa) o alcoholes de azúcar (manitol, sorbitol) al medio de cultivo (Saranya et al., 2020).

Hipótesis

Una concentración adecuada de macerozima, celulasa y pectinasa, junto con el uso de reguladores osmóticos, permite la obtención y purificación de protoplastos de hoja *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.)

CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

Localización geográfica del ensayo

Este ensayo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Campus Sangolquí (0° 18,81 S; 78° 26,64 O), a una altitud de 2516 m. s. n. m.

Obtención de plantas madre

Para este proyecto se consiguieron 5 plantas jóvenes de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) variedad Biloxi, del sector de Bolívar, ubicado en la Provincia del Carchi. La zona de procedencia se caracterizó por tener una temperatura promedio de 17°C, humedad relativa de 70% y una altitud de 2890 m.s.n.m. Las plantas obtenidas tenían menos de un año de edad y una altura aproximada de 40 cm, con follaje abundante, sin plagas ni enfermedades notables a la vista. Las mismas fueron mantenidas en las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

Tratamiento fitosanitario

Las plantas madre de *Vaccinium corymbosum* L. (Figura 1.) fueron sometidas a un control fitosanitario para reducir la población de microorganismos contaminantes en los tallos y hojas. Para ello, se empleó SKUL-27®, una suspensión de sulfato de cobre pentahidratado a una concentración de 270 g/L. Este agroquímico fue diluido a 2mL/L y se roció con atomizador directamente sobre el área foliar, dos veces por semana. Además, se aplicó la citoquinina 6-BAP (3 mL/L), para estimular la generación de nuevos brotes axilares, una vez por semana.

Figura 1.

Planta de arándano en las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE



Condiciones generales de esterilización y cultivo *in vitro*

Todos los medios de cultivo preparados para este ensayo fueron ajustados a un pH de 5.6 con soluciones de ácido clorhídrico (HCl) e hidróxido de sodio (NaOH) a concentración 1N, antes de adicionar 7,5 g/L de agar. La homogenización de los componentes se realizó por ebullición.

Los materiales necesarios para el trabajo en la cámara de flujo laminar horizontal (Marca: Streamline, Procedencia: Estados Unidos) y los medios de cultivo fueron esterilizados en una autoclave automática (Marca: Tuttnauer, Procedencia: Estados Unidos) durante 20 minutos a 121°C y 1,2 kg cm⁻² de presión. Además, para asegurar las condiciones estériles, los instrumentos fueron expuestos a radiación ultravioleta (UV) por 20 minutos interior de la cámara de flujo laminar.

Figura 2.

Preparación de medios de cultivo.



Tras la siembra de los explantes, los frascos de cultivo fueron trasladados a una sala con una temperatura de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad relativa del 70% y se expusieron a un fotoperiodo de 16 horas bajo condiciones asépticas.

Desinfección de explantes

El objetivo de esta fase se centra en establecer un protocolo de desinfección adecuado para la obtención de explantes de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) libres de contaminación. Para ello, se aplicó el protocolo de desinfección basado en Brenes, Castillo, & Gómez (2015), en el cual se obtuvo un porcentaje de segmentos nodales viables y libres de contaminación del 76%, y se evaluaron diferentes tratamientos variando la concentración del fungicida SKUL-27®.

Se seleccionaron tallos jóvenes poco lignificados de 5 cm de longitud con aproximadamente dos yemas axilares cada uno, se eliminaron todas las hojas y se colocaron en

agua corriente durante 30 minutos, con el fin de eliminar las partículas de polvo de los explantes. Acto seguido, se sumergieron en una solución de detergente al 2% (p/v) y 12 gotas de Tween 20/L durante 15 minutos. A continuación, los segmentos nodales se pusieron en una solución de etanol al 70% (v/v) durante 1 minuto y luego fueron sometidos a una solución de SKUL-27® cuya concentración varía según los tratamientos (Tabla 3), para lo cual se realizaron 20 repeticiones, con un explante por tubo de ensayo con medio semisólido. Finalmente, se utilizó hipoclorito de sodio 3% (v/v) durante 5 minutos y se trasladó el material vegetal a la cámara de flujo laminar (Marca: Streamline, Procedencia: Estados Unidos). Al terminar cada paso de desinfección se realizaron tres lavados con agua destilada estéril.

Tabla 3.

Tratamientos de desinfección con Skul-27®.

Tratamiento	Concentración (mL/L)	Tiempo de inmersión
T0 (Control)	0	0
T1	2	5
T2	2	10
T3	4	5
T4	4	10
T5	6	5
T6	6	10

Posteriormente, en la cámara de flujo laminar, se cortaron los extremos oxidados y se separaron las yemas axilares hasta obtener explantes de aproximadamente 1.5 cm con una yema axilar cada uno. Inicialmente, los explantes se sembraron en medio de cultivo semisólido con sales de Murashige y Skoog (1962) sin reguladores de crecimiento para evaluar la eficiencia del protocolo de desinfección.

La observación de resultados se realizó a los 7 y 14 días de cultivo, se evaluó la contaminación por hongo o bacteria asignando valores de 1 para presencia y 0 para ausencia y en el caso de oxidación se asignó el valor de 1 para los oxidados y 0 para los explantes viables, siendo considerado cada explante como una unidad experimental. Para el análisis estadístico se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) para definir el valor p de las variables de respuesta. Acto seguido se corrió un test de Shapiro Wilks modificado para determinar si los datos siguen una distribución normal y finalmente, se realizó una prueba de Kruskal Wallis para evaluar la formación de subgrupos de acuerdo a los rangos de cada tratamiento de desinfección.

Inducción y multiplicación de brotes *in vitro*

El objetivo de esta fase es el establecimiento y propagación de los brotes de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) *in vitro* que servirán como material base para el aislamiento de protoplastos de hoja. Para lo cual, se trasplantaron los explantes viables de la fase de desinfección a un medio de cultivo semisólido descrito por Castro (2016), que consiste en Woody Plant Medium (WPM, Lloyd McCown 1981) suplementado con 3 mg/L de 6-BAP, 30 g/L de sacarosa y 7 g/L de agar.

Adicionalmente, se agregó 0.5 g/L de carbón activado, para mitigar la oxidación, ya que este componente constituye un soporte poroso con capacidad de atraer compuestos fenólicos que son liberados por el explante o se producen durante el autoclavado y contribuyen al oscurecimiento de los tejidos. Este fenómeno ocurre principalmente en especies leñosas establecidas *in vitro* (Azofeifa, 2009).

Obtención de protoplastos a partir de hojas *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.)

Dentro del área de la cámara de flujo laminar, se pesó 1 g de hojas de arándano previamente establecidas *in vitro* (Figura 3) y se picaron finamente con un bisturí, para aumentar la superficie de contacto del tejido foliar con la solución enzimática (Power & Davey, 1990). Las hojas picadas se colocaron en un matraz Erlenmeyer y se mezclaron con 5mL de medio BH3 0.7M a pH 5.7 (Tabla 4) para evitar el daño producido por el potencial osmótico en los protoplastos aislados.

Tabla 4.

Componentes del medio BH3 0.7M

Componentes	Concentración ($mg \cdot L^{-1}$)	Componentes	Concentración ($mg \cdot L^{-1}$)
KH ₂ PO ₄	170	Retinol	0.01
K ₂ HPO ₄	170	Colecalciferol	0.01
Microelementos de MS	10 ml	Cianocobalamina	0.02
Vitaminas del MS	10ml	Fructosa	250
Pantotenato de calcio	1	Ribosa	250
Ácido ascórbico	2	Xilosa	250
Cloruro de colina	1	Manosa	250
Ácido p-aminobenzoico	0.02	Celobiosa	250
Ácido fólico	0.4	Galactosa	250
Rivoflavina	0.2	Sacarosa	85560
Biotina	0.01	Manitol	250
Ácido fumárico	40	Piruvato de sodio	20
Agua de coco	20ml/L	Ácido cítrico	40
Glutamina	3100	Ácido málico	40

Figura 3.

Explantos de arándano establecidos in vitro para el aislamiento de protoplastos.



Posteriormente, se adicionó 5 mL de solución enzimática compuesta por: manitol 0.7 M, cloruro de calcio 12 mM, MES 6 mM, fosfato monobásico de sodio 13mM y las enzimas correspondientes a cada tratamiento de aislamiento (Tabla 5). La mezcla se sometió a presión de vacío para que las hojas puedan romper la tensión superficial y sumergirse totalmente en la solución enzimática para facilitar la eliminación de la lamela media. En este paso, los matraces Erlenmeyer se sellaron con una lámina Parafilm para asegurar la asepsia y se llevaron a incubación en la oscuridad a 90 revoluciones por minuto (rpm) y una temperatura de 27°C (Rivera & Jadán, 2010; Rodríguez & Dallos, 2004).

Se observó la cantidad de protoplastos aislados en intervalos de 2 horas desde las 20 hasta las 34 horas de incubación.

Tabla 5.

Tratamientos planteados para el aislamiento de protoplastos

Tratamiento	Celulasa	Macerozima	Pectinasa
Ta1	1%	1%	0.3%
Ta2	1%	1.5%	0.3%
Ta3	1.5%	1%	0.3%
Ta4	1.5%	1.5%	0.3%

Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento, la unidad experimental fue un matraz Erlenmeyer de 25 mL con 1 g de tejido vegetal, 5 mL de medio BH3 0.7M y 5 mL de solución enzimática. Los resultados fueron evaluados en intervalos de dos horas entre las 24 y 34 horas de digestión. La variable de respuesta fue la cantidad de protoplastos por gramo de peso fresco.

Figura 4.

Hojas de arándano trituradas y mezcladas con la solución enzimática y el medio BH3, en un matraz Erlenmeyer



Para cuantificar la cantidad de protoplastos, se tomaron 10 uL de muestra y se colocaron en el área central de la cámara de Neubauer, se realizó el conteo en los cuadros

laterales y el cuadro central para obtener el número total de protoplastos empleando la siguiente fórmula (Bastidas, 2008):

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Número de células viables} \times 10000}{\text{Número de recuadros}}$$

Posteriormente se calcularon los protoplastos conseguidos por gramo de peso fresco con la siguiente fórmula:

$$\text{Pp/gFW} = \frac{\text{Concentración} \times \text{mL de solución de digestión}}{\text{g de material vegetal}}$$

Revisión bibliográfica de protocolos de aislamiento de protoplastos de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.)

Debido al contexto de la emergencia sanitaria por COVID-19, no fue posible evaluar las siguientes etapas de la obtención de protoplastos de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) de forma práctica. Por tanto, se optó por realizar un análisis bibliográfico de resultados de investigaciones anteriores tanto del aislamiento como purificación y cultivo de protoplastos.

En la actualidad, la información sobre el aislamiento de protoplastos de arándano es muy escasa. Existen pocos experimentos que reportan el uso de protoplastos de esta planta para investigaciones genéticas, como el caso de la inducción de tetraploides de *V. arboreum* con el uso de colchicina, en el cual se aislaron protoplastos como un paso previo a la citometría de flujo (Haring & Lyrene, 2009). Sin embargo, no se han publicado estudios sobre el rendimiento del protocolo de aislamiento. Por tanto, se optó por analizar especies con similitud taxonómica o especies semileñosas de interés.

Para la búsqueda de artículos científicos se usó plataformas de búsqueda de artículos científicos como: Google Scholar, ScienceDirect, Springer Link, Redalyc y Dialnet. Las palabras clave empleadas fueron: “*Vaccinium protoplast*”, “*Ericales protoplast*”, “*Vaccinium corymbosum*” y “*Woody plant protoplast*”, también se aplicó un filtro para que se desplieguen únicamente los estudios publicados en los últimos 10 años. De los resultados encontrados, se seleccionaron 10 artículos científicos con información relevante.

A partir de ello, se organizó una matriz incluyendo la especie investigada, año de la publicación, autores, país de origen y material vegetal de partida. Acto seguido, se analizaron los datos de cada protocolo para poder compararlos, entre estos se incluyen: composición del cóctel enzimático, tiempo de digestión, concentración de células obtenidas, tiempo y velocidad de centrifugación, para el aislamiento. Además, en la fase de purificación se evaluó la concentración de manitol y sacarosa como reguladores osmóticos y en la fase de cultivo se analizaron los medios de cultivo empleados.

Revisión bibliográfica sobre protocolos de purificación de protoplastos de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.)

Esta fase de experimentación tiene como objetivo la purificación de los protoplastos y la eliminación de los componentes no digeridos y restos celulares que se hallarán en la solución. La investigación bibliográfica indica que una vez culminado el tiempo de digestión se toma la solución de aislamiento y se tamizará a través de una malla metálica estéril de 45-80 μm mesh para separar los tejidos que no fueron digeridos por las enzimas. La solución obtenida donde se

encontrarán suspendidos los protoplastos se centrifuga durante 5 a 7 minutos de 30-100 g y se retira el sobrenadante.

Seguidamente, se suspenden los protoplastos sedimentados en una solución de lavado de protoplastos CPW-sacarosa y se añade una solución CPW-manitol gota a gota, para generar un gradiente de densidad discontinuo, usualmente se utilizan concentraciones de 25% de sacarosa y 13% de manitol (Liu, 2005). La composición de las soluciones de lavado CPW se muestra en la Tabla 6. Estas soluciones se esterilizan previamente con un filtro de tamaño de poro 0.2 μ m. Finalmente, se separa la interfase formada por los protoplastos entre las soluciones CPW y se resuspende el precipitado en medio de cultivo líquido con un volumen 10 veces mayor al volumen de protoplastos obtenidos (Coleman et al., 2003).

Tabla 6.

Composición de la solución CPW sacarosa o manitol

Composición	Concentración (mg/L)
Nitrato de potasio	101
Cloruro de calcio dihidratado	1480
Sulfato de magnesio heptahidratado	246
Fosfato monobásico de potasio	27,2
Sulfato cúprico pentahidratado	0.025
Yoduro de potasio	0.2
Sacarosa, manitol	De acuerdo al caso

Revisión bibliográfica sobre protocolos de cultivo de protoplastos de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.)

En esta fase el objetivo es evaluar la viabilidad de los protoplastos aislados al comprobar si tienen la capacidad de regenerar su pared celular e iniciar la división celular. La revisión

bibliográfica sugiere que se suspendan los protoplastos en un medio líquido o su incrustación en un medio semisólido. Existen varios medios de cultivo con componentes estandarizados para este proceso, por ejemplo: Murashige y Skoog (1962) o MS, Gamborg et al. (1968) o B5, Kao y Michayluk (1975) o KM8p , Lloyd y McCown (1980) o WPM; y otros medios se modifican a partir de estos, como el BH3 (Liu, 2005).

La bibliografía indica que, para iniciar el cultivo, se agregan de 1 a 3 ml de la suspensión de protoplastos en una caja Petri con el medio líquido o semisólido y se trasladan a una cámara de crecimiento oscura con temperatura de 25 a 28°C. Es más frecuente utilizar una combinación de cultivo líquido más semisólido, de esta manera el medio semisólido se gelifica primero en la placa de Petri sobre la que se añaden los protoplastos suspendidos en un medio líquido.

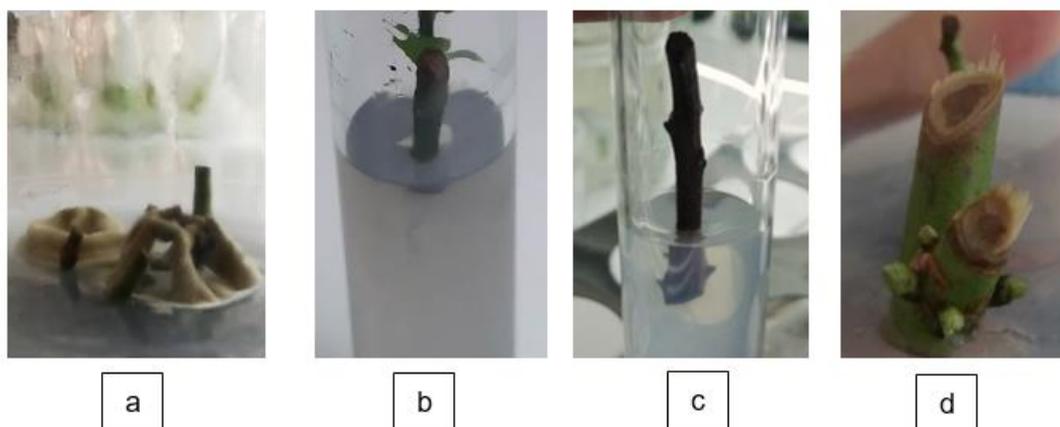
CAPÍTULO 4: RESULTADOS

Desinfección de explantes

En esta fase se evaluó la respuesta de los explantes de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) al tratamiento de desinfección tomado de Brenes, Castillo, & Gómez (2015) y optimizado con la adición de SKUL-27®, un fungicida y bactericida sistémico. Los resultados corresponden a los tratamientos con diferentes concentraciones de SKUL-27® y tiempos de inmersión de los explantes, mostrados en la Tabla 3. Las variables evaluadas fueron la contaminación por hongos o bacterias y la oxidación de los segmentos nodales, cuyos resultados fueron evaluados después de 7 y 14 días y se detallan en la Tabla 7.

Figura 5.

Explantes de segmentos nodales de arándano observados a los 14 días de la siembra



Nota. Explante con contaminación fúngica (a), explante con contaminación bacteriana (b), explante oxidado (c) y explante sano con presencia de brotes (d).

Tabla 7.

Datos obtenidos de los tratamientos de desinfección, respecto a contaminación fúngica, contaminación bacteriana y oxidación, evaluados a los 7 y 14 días de siembra.

Tratamiento	7 días			14 días		
	C. Bacteria	C. Hongo	Oxidación	C. Bacteria	C. Hongo	Oxidación
T0 control	22%	60%	12%	24%	68%	14%
T1	8%	30%	6%	12%	35%	8%
T2	4%	18%	10%	6%	25%	12%
T3	0%	4%	4%	0%	10%	8%
T4	0%	6%	14%	0%	16%	14%
T5	2%	12%	18%	2%	12%	22%
T6	4%	10%	24%	4%	18%	30%

Nota. Los tratamientos se encuentran en la Tabla 3.

De acuerdo al análisis exploratorio de los datos, en el tratamiento control T0, sin el uso de SKUL-27®, se observó una tasa de contaminación recurrente, visible a partir de los 7 días y que aumentó conforme pasó el tiempo, presentando las tasas de contaminación fúngica y bacteriana más elevadas, con un valor de 68% y 24% respectivamente después de 14 días.

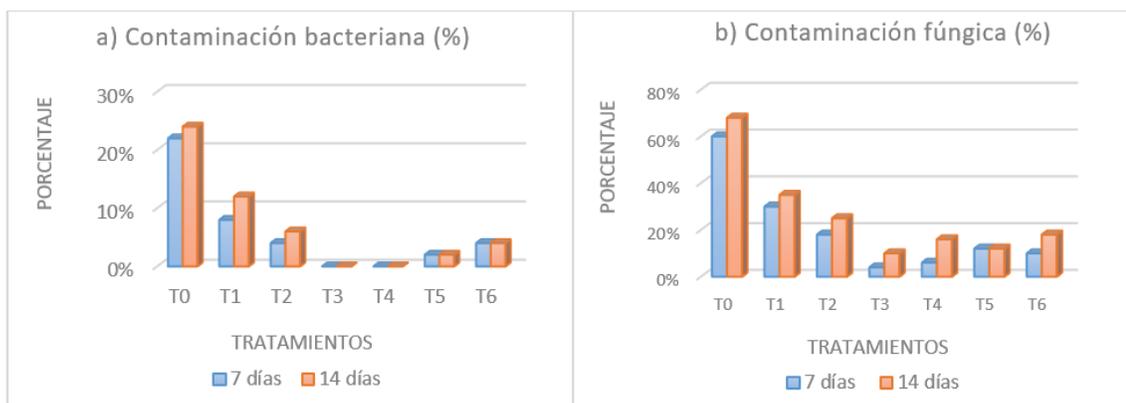
Al analizar la variable contaminación bacteriana, se puede notar que la presencia de bacterias fue menor en comparación a la presencia de hongos en todos los tratamientos, llegando a ser nula en el caso de T3 y T4, como se muestra en la Figura 6a. En cuanto al T1, se puede observar que la contaminación bacteriana tuvo un porcentaje del 12%, siendo el valor más elevado.

Por otro lado, evaluando la variable contaminación fúngica, se pudo notar que los datos arrojados por los tratamientos T1 (35%) y T2 (25%) fueron los más altos para contaminación fúngica, alcanzando valores de 22% y 18% respectivamente. se observó que el tratamiento T3

tuvo un mejor desempeño, con una tasa del 10% a los 14 días de cultivo, como se observa en la Figura 6b.

Figura 6.

Porcentaje de explantes contaminados por hongos y bacterias



Nota. Los resultados fueron evaluados a los 14 y 21 días de siembra.

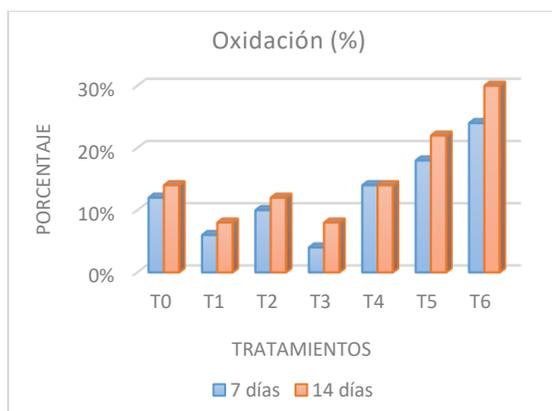
Al evaluar la oxidación de los explantes, los tratamientos T1 y T3 presentaron la tasa más baja transcurridos 14 días correspondiente al 8%. Mientras que el T6 presentó un 30% de oxidación en el mismo periodo de tiempo, siendo el porcentaje más elevado de los tratamientos. Además, se evidencia un incremento en la oxidación a partir del T4, a medida que se aumenta la concentración de SKUL-27® y el tiempo de inmersión de los explantes, lo que se puede observar en la Figura 7.

Al analizar las tres variables de respuesta simultáneamente, se observa que el tratamiento de desinfección con un mejor desempeño fue el T3 (4 mL/L de SKUL-27® y 5

minutos de inmersión), ya que presentó bajas tasas de contaminación y oxidación, mejorando considerablemente la supervivencia de los explantes.

Figura 7.

Porcentaje de explantes oxidados



Nota. Los resultados fueron evaluados a los 14 y 21 días de siembra.

Asimismo, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con el objetivo de identificar si existen diferencias significativas entre los tratamientos frente a las variables de respuesta a los 14 días de cultivo. En base a los valores p obtenidos en los casos de contaminación fúngica y bacteriana y oxidación se determinó que los datos si muestran diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$), los resultados del ANOVA se encuentran en la Tabla 8.

Subsecuentemente, se corrió el test de Shapiro Wilks modificado con un nivel de confianza de 0.05 para determinar si los datos obtenidos corresponden a una distribución normal. Las tres variables de respuesta presentaron un valor de $p < 0.0001$ (Tabla 8), por lo que se rechaza la hipótesis de que los datos tienen distribución normal.

Tabla 8.

Análisis estadístico realizado a los resultados obtenidos en los tratamientos de desinfección.

Variable	ANOVA (p-valor)	Shapiro Wilks (p-valor)	Kruskal Wallis (p-valor)
C. fúngica	<0.0001	<0.0001	<0.0001
C. bacteriana	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Oxidación	0.0225	<0.0001	0.0237

Finalmente, se decidió correr el test de varianza de Kruskal Wallis para diferenciar los tratamientos en subgrupos en caso de existir diferencias significativas. Los resultados muestran que existen si diferencias significativas para las tres variables de respuesta en los tratamientos de desinfección, ya que $p < 0.05$, con un nivel de significancia del 5% (Tablas 9 y 10).

Tabla 9.

Análisis de varianza no paramétrica de Kruskal Wallis para las variables contaminación fúngica y bacteriana.

Tratamiento	Contaminación fúngica			Contaminación bacteriana		
	Media	Rango	Clasificación	Media	Rango	Clasificación
T5	0.04	149.00	A	0.02	167.00	A B
T3	0.04	149.00	A	0.00	163.50	A
T4	0.06	152.50	A	0.00	163.50	A
T6	0.12	163.00	A B C	0.04	170.50	A B
T2	0.18	173.50	B C	0.06	174.00	A B
T1	0.22	180.50	C	0.12	184.50	A B
T0	0.68	261.00	D	0.24	205.50	B

Nota. Las medias con una letra común no son significativamente diferentes.

Para las variables contaminación fúngica y bacteriana se obtuvo que los tratamientos T6 y T2 tienen diferencias significativas con el resto de tratamientos, con un nivel de significancia de 5%. Sin embargo, los tratamientos que presentaron medias menores fueron T5, T3 y T4,

evidenciando que son los mejores tratamientos de desinfección para las dos variables analizadas. Además, se evidenció que el tratamiento control T0 tuvo el peor desempeño, ya que tiene categoría D para contaminación fúngica y C para contaminación bacteriana, con la media más elevada en ambos casos.

Tabla 10. Análisis de varianza no paramétrica de Kruskal Wallis para la variable oxidación.

Tratamiento	Media	Rango	Clasificación
T1	0.08	162.50	A
T3	0.08	162.50	A
T2	0.12	169.50	A
T4	0.14	173.00	A B
T0	0.14	173.00	A B
T5	0.22	187.00	B
T6	0.30	201.00	C

Nota. Las medias con una letra común no son significativamente diferentes.

Por otro lado, al analizar la variable oxidación se obtuvo que los tratamientos T1, T3 y T2 presentaron los valores de media más bajos y por tanto pueden ser considerados tratamientos idóneos para desinfección con una baja tasa de oxidación de los explantes. Además, el tratamiento T6 demostró ser el menos adecuado ya que tiene la media más elevada (0.3).

Aislamiento de protoplastos

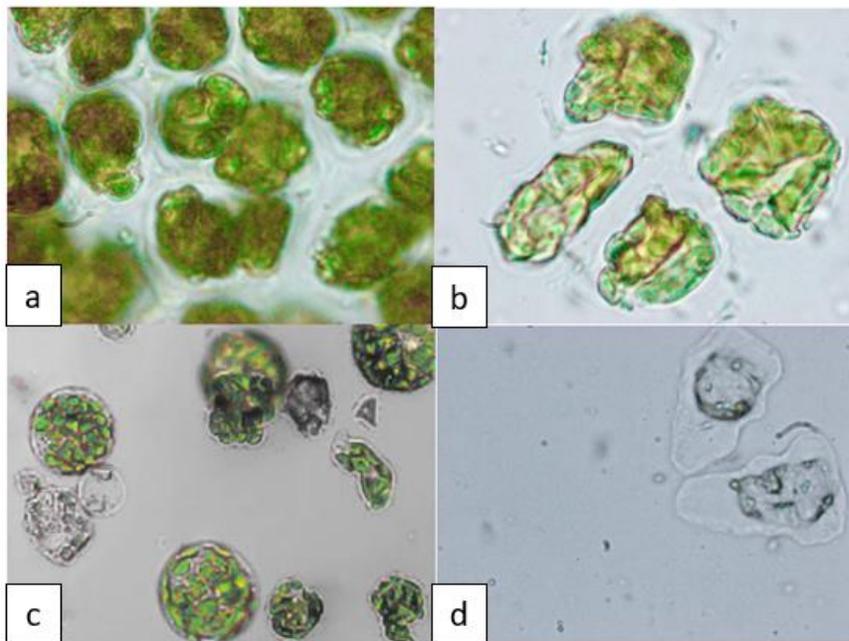
Resultados de los tratamientos enzimáticos para el aislamiento de protoplastos de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.)

En este experimento, se evaluó el efecto de cuatro combinaciones de enzimas (celulasa, macerozima y pectinasa) a diferentes tiempos de incubación con el objetivo de digerir la pared celular de mesófilo de arándano cultivado *in vitro*. Resultados preliminares demostraron que, en las primeras horas de incubación no existe liberación de protoplastos y que a partir de las 20

horas de digestión se empieza a observar una pequeña cantidad de protoplastos en la solución de digestión.

Figura 8.

Protoplastos de hojas in vitro de arándano observados con un aumento de 100x



Nota. Las fotografías fueron hechas realizadas a diferentes tiempos de incubación. a) 14 horas, b) 18 horas, c) 28 horas y d) 34 horas

En la Figura 8 se puede observar que, a las 14 horas de digestión enzimática existen múltiples cúmulos celulares, a las 18 horas se da la separación de las células. Posteriormente, a partir de las 20 horas de digestión se puede distinguir la formación de protoplastos y estos pueden ser cuantificados en un hemocitómetro. Finalmente, al exceder el tiempo de incubación, se puede observar la destrucción de la membrana celular y la fuga de los organelos citoplasmáticos.

La cantidad de protoplastos por mililitro de solución se evaluó en intervalos de 2 horas desde las 20 hasta las 34 horas de incubación con un hemocitómetro. En la Tabla 11 se muestra el número de protoplastos promedio por cada gramo de hojas frescas ($n=3$), evaluado para cada tiempo de incubación.

Tabla 11.

Resultados de la cantidad de protoplastos promedio de arándano ($n=3$).

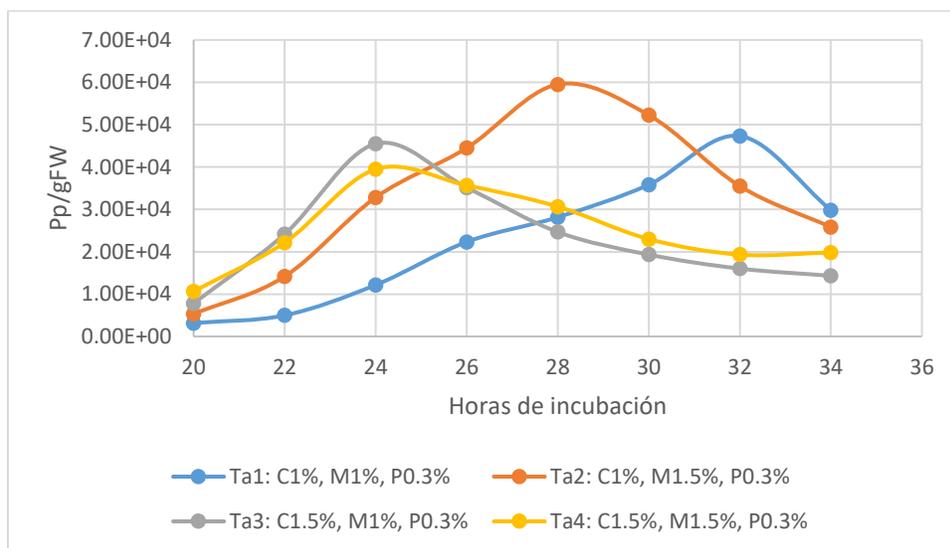
Horas de incubación	Ta1 (Pp/gFW)	Ta2 (Pp/gFW)	Ta3 (Pp/gFW)	Ta4 (Pp/gFW)
20	3.17E+03	5.33E+03	7.83E+03	1.07E+04
22	5.00E+03	1.42E+04	2.42E+04	2.22E+04
24	1.22E+04	3.28E+04	4.55E+04	3.95E+04
26	2.23E+04	4.45E+04	3.52E+04	3.57E+04
28	2.82E+04	5.95E+04	2.47E+04	3.07E+04
30	3.58E+04	5.23E+04	1.93E+04	2.30E+04
32	4.73E+04	3.55E+04	1.60E+04	1.93E+04
34	2.98E+04	2.58E+04	1.43E+04	1.98E+04

Nota. Pp/gFW=protoplastos por gramo de peso fresco. Se marcaron en rojo los tiempos de incubación con mayor rendimiento para cada tratamiento.

De los resultados obtenidos se puede observar que la concentración de protoplastos fue aumentando con el tiempo hasta llegar a su punto máximo y luego se observó una disminución en el número protoplastos. Los mejores tiempos de incubación son 32, 28, 24 y 24 horas, respectivamente para los tratamientos Ta1, Ta2, Ta3 y Ta4. Además, en la Figura 9, se puede observar gráficamente los datos obtenidos.

Figura 9.

Curvas de concentración promedio (n=3) de protoplastos de arándano aislados, tratados durante 34 horas.



Nota: C= celulasa, M=macerozima, P=pectinasa, Pp/gFW=protoplastos por gramo de peso fresco

Posteriormente, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos. Los resultados se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12.

Análisis de varianza de los tratamientos de aislamiento de protoplastos

F. V.	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	p-valor
Modelo	41606250000.00	3	13868750000.00	16.28	0.0009
Tratamiento	41606250000.00	3	13868750000.00	16.28	0.0009
Error	6816666666.67	8	852083333.33		

El p-valor es menor a 0.05, con un nivel de significancia del 5%, lo cual indica que si existen diferencias significativas entre los tratamientos aplicados. Por tanto, se ejecutó una prueba de Tukey (Tabla 13) para categorizar los tratamientos en subgrupos de acuerdo a sus medias. Los subgrupos obtenidos indican que el tratamiento con la media más alta es Ta2 (298333.33), que en este caso es favorecedor ya que demuestra que se lograron aislar más protoplastos con esta composición enzimática.

Tabla 13.

Prueba de Tukey para los tratamientos de aislamiento de protoplastos

Tratamiento	Media	Subgrupo
Ta3	143333.33	A
Ta4	198333.33	A B
Ta1	258333.33	B
Ta2	298333.33	C

Nota: las medias con una letra común no son significativamente diferentes.

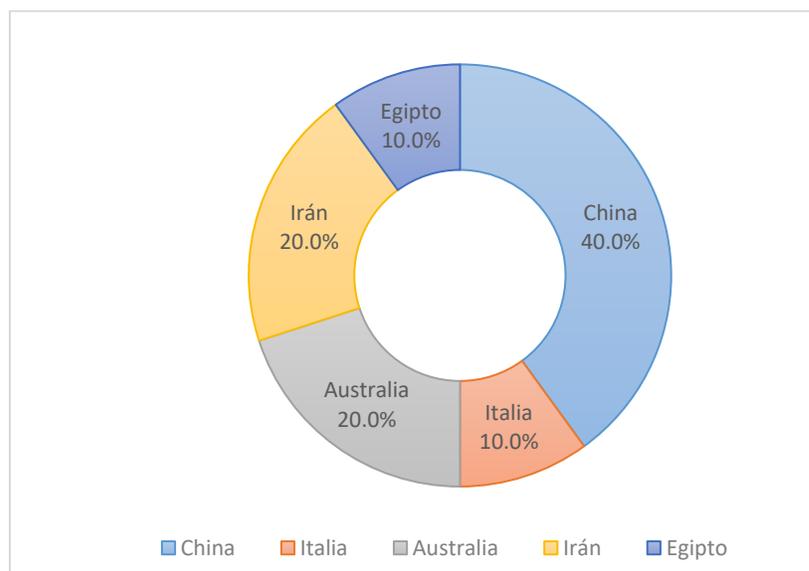
Datos obtenidos de la revisión bibliográfica

La búsqueda de artículos científicos se ejecutó en Google Scholar, ScienceDirect, Springer Link, Realy y Dialnet. No se han reportado investigaciones sobre un protocolo de aislamiento de protoplastos en el género *Vaccinium*, pero se encontraron ensayos realizados en especies del orden de los Ericales como la planta de té (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze), el modroño (*Arbutus unedo* L.) y el rododendro (*Rhododendron spp.*). Además, se seleccionaron estudios realizados en plantas arbustivas y frutales de interés: el jasmín (*Jasminum sambac* L.), el árbol de la vida (*Platyclusus orientalis* (L.) Franco), el árbol de seda (*Albizia julibrissin* Durazz), la flor de cera (*Chamelaucium uncinatum* Schauer), la manzana (*Malus domestica* Borkh) y el

guayabo (*Psidium guajava* L.). Finalmente se escogió un estudio realizado en mesófilo de algodón (*Gossypium hirsutum* L.) por ser considerada una importante planta modelo.

Figura 10.

Países con investigaciones sobre el aislamiento de protoplastos de especies del orden de los Ericales y especies arbustivas de interés.



La mayoría de los estudios referenciados utilizaron hojas de plantas cultivadas *in vitro* para el aislamiento de los protoplastos (n=10). Mientras que solamente un 30% utilizaron hojas recolectadas de plantas *in vivo*. A continuación, se resume la concentración de componentes del coctel enzimático, tiempo de incubación, regulador osmótico y tiempo de incubación de cada uno de los artículos científicos (Tabla 14).

Tabla 14.

Artículos científicos revisados para el análisis de técnicas de aislamiento de protoplastos.

Referencia	Especie	Fuente	Revista/Cuartil
The Studies on Technique Conditions of Protoplast Isolation and Purification of Three Species of <i>Rhododendron</i> (Tu et al., 2009).	Rododendro	Hojas <i>in vitro</i>	CNKI/Q2
Efficient isolation and purification of tissue-specific protoplasts from tea plants (<i>Camellia sinensis</i> (L.) O. Kuntze) (Xu et al., 2021).	Planta de té	Hojas <i>ex vitro</i>	Plant Methods/Q1
Optimized conditions for the isolation of mesophyll protoplasts from <i>Arbutus unedo</i> and their use in single cell gel electrophoresis (Choury et al., 2018).	Modroño	Hojas <i>ex vitro</i>	Springer Nature/Q1
Protoplast isolation and plant regeneration of guava (<i>Psidium guajava</i> L.) using experiments in mixture-amount design (Rezazadeh & Niedz, 2015).	Guayabo	Hojas <i>in vitro</i>	Springer Science/Q1
Protoplast Isolation, Fusion, Culture and Transformation in the Woody Plant <i>Jasminum spp</i> (Ahmed et al., 2021).	Jasmín	Hojas <i>in vitro</i>	MDPI Agriculture/Q1
Protoplast isolation for species in the <i>Chamelaucium</i> group and the effect of antioxidant enzymes on protoplast viability (Ratanasanobon & Seaton, 2013).	Flor de cera	Hojas <i>in vitro</i>	Springer Science/Q1
Mesophyll protoplast isolation technique and flow cytometry analysis of ancient <i>Platycladus orientalis</i> (Cupressaceae) (Zhou et al., 2019).	Árbol de la vida	Hojas <i>in vitro</i>	Turkish Journal of Agriculture and Forestry/Q2
Protoplast isolation and genetically true-to-type plant regeneration from leaf- and callus-derived protoplasts of <i>Albizia julibrissin</i> (Rahmani et al., 2016).	Árbol de seda	Hojas <i>in vitro</i>	Springer Science/Q1
Pre-isolation, isolation and regeneration protoplasts from leaf mesophyll of <i>in vivo Malus domestica</i> (El-Gioushy et al., 2019).	Manzana	Hojas <i>ex vitro</i>	Revista Brasileira de Fruticultura/Q3
Isolation of mesophyll protoplast and establishment of gene transient expression system in cotton (Li et al., 2014).	Algodón	Hojas <i>in vitro</i>	China Crops/Q3

Tabla 15.

Resumen de las técnicas de aislamiento de protoplastos de los estudios analizados

Espece vegetal	Combinación enzimática		Regulador osmótico	pH	Tiempo de incubación
<i>Rhododendron spp.</i>	Celulasa Pectinasa	2% 1%	Manitol 9%	6	14 horas
<i>Camellia sinensis</i> (L.) O. Kuntze	Celulasa Macerozima	1.5% 0.6%	0.4M Manitol	5.7	10 horas
<i>Arbutus unedo</i> L.	Celulasa Macerozima	4% 1%	0.8M Manitol	5	16 horas
<i>Psidium guajava</i> L.	Celulasa Macerozima Hemicelulasa	2.4% 3% 0.6%	0.75M Manitol 6mM MES	5.8	10 horas
<i>Jasminum sambac</i> L.	Celulasa Pectinasa Macerozima	1.5% 0.8% 0.4%	0.4M Manitol 0.2M MES	5.7	8 horas
<i>Chamelaucium uncinatum</i> Schauer	Celulasa Pectoliasa Macerozima	1% 0.1% 0.5%	0.6M Manitol	5	16-18 horas
<i>Platyclusus orientalis</i> (L.) Franco	Celulasa Pectoliasa Macerozima Ligninasa	1.5% 0.4% 0.4% 1%	0.7M Manitol	5	16 horas
<i>Albizia julibrissin</i> Durazz	Celulasa Pectoliasa	1.5% 1%	0.7M Manitol	5.5	6 horas
<i>Malus domestica</i> Borkh	Celulasa Pectinasa Macerozima	1.5% 0.5% 1.5%	13% Manitol	5.8	20 horas
<i>Gossypium hirsutum</i> L.	Celulasa Macerozima	1.5% 0.4 %	0.5M Manitol	5.5	8 horas

En la Tabla 15 se encuentran los artículos científicos seleccionados incluyendo datos como la referencia bibliográfica, fuente del material vegetal para el aislamiento, año de publicación, revista y cuartil. El 70% de estos estudios fueron publicados en revistas de alto impacto con Q1 (n=7). En cada uno de los experimentos seleccionados se cuantificó la cantidad de protoplastos por cada gramo de tejido foliar fresco (n/g FW) y el porcentaje de viabilidad. Estos resultados se resumen en la Tabla 16.

Tabla 16.

Resultados de rendimiento y porcentaje de viabilidad de los protoplastos aislados en los artículos científicos seleccionados

Especie vegetal	Rendimiento (10⁶ n/g FW)	Viabilidad (%)
<i>Rhododendron spp.</i>	1.47	79.27
<i>Camellia sinensis</i> (L.) O. Kuntze	3.27	92.94
<i>Arbutus unedo</i> L.	61.3	100
<i>Psidium guajava</i> L.	3.72	90
<i>Jasminum sambac</i> L.	5.4	89.6
<i>Chamelaucium uncinatum</i> Schauer	0.8	88.3
<i>Platyclusus orientalis</i> (L.) Franco	4.8	82.5
<i>Albizia julibrissin</i> Durazz	0.77	94
<i>Malus domestica</i> Borkh	0.2	80
<i>Gossypium hirsutum</i> L.	1	83.5

Purificación de protoplastos en base a análisis bibliográfico

Después de determinar el tiempo de incubación, la composición del coctel enzimático y la concentración del regulador osmótico adecuado, es necesario realizar un proceso de purificación para separar los protoplastos aislados del coctel enzimático y de fragmentos de tejido no digerido. En primera instancia se realiza una centrifugación de la solución de digestión,

las condiciones de centrifugación ejecutadas los artículos científicos seleccionados se resumen en la Tabla 17.

Tabla 17.

Condiciones de centrifugado aplicadas a los estudios analizados

Especie vegetal	Velocidad	Tiempo (min)
<i>Rhododendron spp.</i>	1000 rpm	6
<i>Camellia sinensis</i> (L.) O. Kuntze	200 g	3
<i>Arbutus unedo</i> L.	1000 g	5
<i>Psidium guajava</i> L.	100 g	5
<i>Jasminum sambac</i> L.	200 g	5
<i>Chamelaucium uncinatum</i> Schauer	150 g	5
<i>Platycladus orientalis</i> (L.) Franco	100 g	3
<i>Albizia julibrissin</i> Durazz	100 g	5
<i>Malus domestica</i> Borkh	1000 rpm	7
<i>Gossypium hirsutum</i> L.	100 g	3

En el caso de los protoplastos de *Jasminum spp.*, se reporta un paso más a la purificación, ya que utilizan una solución de sacarosa para generar un gradiente de densidad discontinuo. Se colocaron 2 ml de suspensión de protoplastos junto con 4 ml de sacarosa en solución al 25% añadida gota a gota. Después se centrifugó a 809 g durante 3 min y los protoplastos se recogieron de la interfase de densidad intermedia para luego ser resuspendidos en medio de cultivo (Rezazadeh & Niedz, 2015).

Cultivo de protoplastos en base a análisis bibliográfico

Los protoplastos aislados y purificados pueden ser cultivados en un medio de cultivo para inducir la formación las paredes celulares y generar microcallos. Para establecer las condiciones óptimas esta fase se debe determinar la densidad celular ideal para el cultivo

(protoplastos por mililitro- Pp/mL), establecer un balance auxinas y citoquininas adecuado y mantener el regulador osmótico en el medio de cultivo hasta que la pared celular se haya formado nuevamente (Coleman et al., 2003).

Únicamente los estudios relacionados al árbol de seda (*Albizia julibrissin* Durazz), guayabo (*Psidium guajava* L.), jasmín (*Jasminum sambac* L.) y manzana (*Malus domestica* Borkh) contemplan el cultivo de sus protoplastos. En la Tabla 18 se presenta un resumen de las condiciones de cultivo de los mismos.

Tabla 18.

Condiciones de cultivo de protoplastos

Especie vegetal	Medio de cultivo	Reguladores de crecimiento	Densidad celular (Pp/mL)
<i>Psidium guajava</i> L.	MS sin NH ₄ NO ₃	1mg/L ANA 3.4 mg/L 6-BAP	1x10 ⁵
<i>Jasminum sambac</i> L.	WPM	0.2 mg/L ANA 2 mg/L 6-BAP	1x10 ⁵
<i>Albizia julibrissin</i> Durazz	KM	2.7 µM ANA 2.7 µM 6-BAP	3–5x10 ⁵
<i>Malus domestica</i> Borkh	KM B5	1 mg/L ANA 0.3 mg/L 6-BAP	2x10 ⁵

CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN

En este proyecto se analizaron diferentes tratamientos de desinfección de segmentos nodales de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) con el fin de establecer un protocolo de desinfección óptimo para su cultivo *in vitro*. Además, se aislaron protoplastos de arándano a partir de hojas cultivadas *in vitro*, empleando varios tratamientos de soluciones enzimáticas, con el objetivo de determinar la concentración de enzimas con mejor rendimiento.

No obstante, en vista de que no se han publicado estudios sobre el aislamiento, purificación y cultivo de protoplastos en esta especie o en plantas del mismo género, se procedió a analizar varios estudios realizados en tres especies pertenecientes al orden de los Ericales (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, *Arbutus unedo* L., *Rhododendron spp.*), 6 especies leñosas o frutales de interés comercial (*Albizia julibrissin* Durazz, *Psidium guajava* L., *Jasminum sambac* L., *Platyclusus orientalis* (L.) Franco, *Chamelaucium uncinatum* Schauier y *Malus domestica* Borkh) y una planta modelo perteneciente a la familia de las malváceas (*Gossypium hirsutum* L.).

Desinfección de explantes

Los microorganismos que comúnmente se presentan en condiciones *in vitro* son bacterias y hongos, aunque también suceden casos menos frecuentes de contaminación por virus, viriones y artrópodos microscópicos (Hernández & González, 2010).

El protocolo de desinfección se modificó a partir de Brenes, Castillo, & Gómez (2015), se empezó con un lavado con agua corriente durante 30 minutos para desprender las partículas de tierra que pudieran existir en la superficie de los segmentos nodales, acto seguido se utilizó

detergente 2% (p/v) con 12 gotas de Tween 20/L durante 15 minutos, alcohol etílico al 70% (v/v) durante 1 minuto, e hipoclorito de sodio al 3% (v/v). En este experimento se reportó un porcentaje de explantes vivos del 76% en arándano variedad Sharpblue.

En ensayos preliminares se obtuvo una alta tasa de contaminación por hongos, por tanto, se decidió añadir un agente fungicida al protocolo de desinfección. SKUL-27[®] fue seleccionado tanto para el tratamiento fitosanitario como para la desinfección en el laboratorio, ya que su ingrediente activo es el sulfato de cobre pentahidratado, el cual funciona como un agente preventivo y curativo de enfermedades vinculadas a bacterias y hongos patógenos (Agripac, 2021).

Pasados los 14 días de cultivo, en la variable contaminación fúngica se observaron porcentajes desde el 22% al 4%, el análisis estadístico concluyó que existen diferencias significativas entre los tratamientos de desinfección. Los tratamientos T3 y T5 lograron el menor porcentaje de presencia de hongos (10 y 12%), mientras que el tratamiento T1 obtuvo el valor más elevado (35%). Resultados que demuestran que a mayor concentración de SKUL-27[®], menor incidencia de hongos y bacterias contaminantes. Esto puede ser atribuido a la capacidad del sulfato de cobre pentahidratado para limitar la germinación de esporas al desnaturalizar sus proteínas (Husak, 2015). Además, los datos muestran que la tasa de contaminación fúngica fue mayor a la bacteriana para todos los tratamientos de desinfección. En estudios realizados por Aquije (2020) con arándano variedad Biloxi, se reportaron resultados similares, ya que la contaminación por hongos (73%) fue superior al de las bacterias (27%).

Analizando la variable contaminación bacteriana, se obtuvo que los mejores tratamientos fueron T3 y T4, en los que hubo ausencia de bacterias. En contraste con los resultados obtenidos por Brenes, Castillo, & Gómez (2015), se disminuyó el porcentaje de contaminación, del 2.5% al 0%. Esta diferencia pudo haber ocurrido por la adición de SKUL-27® al protocolo de desinfección. Husak (2015), sostiene que el ion cobre interrumpe el funcionamiento de proteínas y enzimas encontradas en la membrana celular, ocasionando la fuga de los componentes celulares.

La oxidación es un problema que suele ocurrir en las especies leñosas introducidas *in vitro*, llevando al oscurecimiento y necrosamiento de los explantes y limitando la sobrevivencia de los mismos (Azofeifa, 2009). Los resultados de este ensayo muestran que el tratamiento T6 tuvo la mayor tasa de oxidación (30%), con la concentración y tiempo de exposición más elevados de SKUL-27®. Sharry et al. (2020), indica que el estrés oxidativo puede ocurrir por la liberación de radicales libres durante el proceso de desinfección debido a la exposición a sustancias dañinas. Por otro lado, el tratamiento T1 y T3 obtuvieron el índice más bajo de oxidación (8%), probablemente porque se empleó un menor tiempo de inmersión en SKUL-27®.

Con el paso del tiempo, se observó un incremento en la cantidad de explantes oxidados. Neumann et al. (2020), menciona que la liberación de sustancias fenólicas al medio de cultivo puede influir en la oxidación del explante. En este sentido, la incorporación de carbón activado de 0.1% a 5% al medio de cultivo, ha demostrado mitigar los efectos de la oxidación, posiblemente por su capacidad para atraer metabolitos tóxicos (Roca & Mroginski, 1991). Como

medida mitigante, en este ensayo se decidió añadir 0.5 g/L de carbón activado al medio de cultivo para inducir la proliferación de brotes.

En base a los resultados observados para las tres variables de respuesta y al análisis estadístico, se llegó a la conclusión de que el tratamiento más adecuado para la desinfección de los explantes es el T3 ya que se anuló la contaminación causada por bacterias y se minimizó la contaminación por hongos al 10%, mientras que el porcentaje de oxidación se mantuvo por debajo del 8%.

Aislamiento de protoplastos

El aislamiento de protoplastos de especies de plantas leñosas se inició hace más de 30 años, por Ochatt et al. (1987), quienes realizaron un experimento en cereza (*Prunus avium* × *pseudocerasus*). En contraste con el aislamiento de protoplastos de especies herbáceas, el estudio de las gimnospermas va muy por detrás. La información disponible sobre protoplastos de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) es muy escasa, resultando evidente la necesidad de nuevas investigaciones sobre esta especie.

Para este ensayo se recolectaron hojas de arándano de corta edad producidas *in vitro*. Suarez (2020), menciona que el rendimiento y la viabilidad de los protoplastos se pueden ver afectados por la fuente de los protoplastos, ya que, dependiendo del origen del material vegetal hay diferencias en la composición de lignina, celulosa y pectina en su pared celular y lamela media, por lo que también son diferentes las enzimas requeridas y sus concentraciones. Además, de acuerdo con Roca & Mroginski (1991), es importante utilizar material vegetal

juvenil del tejido original porque en las células jóvenes es más fácil inducir la actividad mitótica que en las células altamente especializadas.

Una particularidad de los protoplastos es su fragilidad osmótica, por ello el regulador osmótico debe ajustarse para mantener las condiciones isotónicas durante el aislamiento para que los protoplastos aislados conserven un estado esférico (Power & Davey, 1990). En el protocolo de aislamiento ejecutado se utilizó CPW con manitol al 13%. Estudios anteriores han demostrado que las plantas que sintetizan naturalmente manitol tienen mejor tolerancia al estrés salino, ya que este azúcar-alcohol puede mantener un perímetro de hidratación artificial alrededor de las membranas debido a su cantidad de grupos hidroxilo, resguardándolas del ataque de radicales libres oxidativos y estabilizando estructuralmente la célula en condiciones isotónicas (Patel & Williamson, 2016).

También hay que ser muy minuciosos al establecer la concentración del regulador osmótico, ya que cuando la concentración es muy baja, dará como resultado la lisis del protoplasto y una disminución en el rendimiento. Por otro lado, cuando existe un exceso se inducirá a los protoplastos a encogerse hasta llegar a la plasmólisis (Chakraborty, 2016).

Los resultados obtenidos de los tratamientos de aislamiento (Tabla 11) indican que para el Ta2 (1% celulasa, 1.5% macerozima, 0.3% pectinasa) el mejor tiempo de incubación fue de 28 horas, obteniendo un promedio de 5.95×10^4 Pp/gFW. Además, de acuerdo con los subgrupos formados en el test de Tukey, se puede concluir que este es el mejor tratamiento, al presentar la media más elevada (Tabla 13).

Por otro lado, los experimentos sobre el aislamiento de protoplastos de Ericales, muestran que en el caso de *Camellia sinensis*, se obtuvo una concentración máxima de 3.27×10^6 Pp/gFW a las 10 horas de incubación empleando una concentración de 1.5% de celulasa y 0.6% de macerozima (Xu et al., 2021). Asimismo, en el estudio realizado en *Arbutus unedo* L. se obtuvieron 61.3×10^6 Pp/gFW en horas de incubación con 4% de celulasa y 1% de macerozima a las 16 horas de incubación (Choury et al., 2018). Y en *Rhododendron spp* se consiguieron 1.47×10^6 Pp/gFW empleando 2% de celulasa y 1% de pectinasa a las 14 horas (Tu et al., 2009). Estos resultados sugieren que para el arándano se pueden plantear tratamientos a mayor concentración de enzimas para aumentar el rendimiento y disminuir el tiempo de incubación.

Purificación de protoplastos

Después de finalizar el tratamiento de aislamiento, se obtiene una suspensión que contiene los protoplastos liberados junto con tejido no digerido, restos celulares, protoplastos rotos y enzimas. La purificación consiste en separar la mayor cantidad de protoplastos de los otros componentes evitando provocar daños en los mismos, para ello se filtra la suspensión y se realiza un paso de centrifugado que puede ser seguido de la separación por gradiente de densidad (Liu, 2005).

En la Tabla 17 se puede observar que, para los experimentos analizados, la velocidad de centrifugación va desde los 100 g hasta los 1000 g con una duración que puede variar desde 3 hasta 7 minutos. Castro (2017), menciona que la estandarización de las condiciones de centrifugado depende de factores como el genotipo de la especie vegetal utilizada y la

estabilidad de los protoplastos. Por tanto, es posible que sea necesario establecer la velocidad y el tiempo de la centrifugación de forma empírica para diferentes sistemas de protoplastos.

La sacarosa se usa ampliamente para generar un gradiente de densidad y purificar los protoplastos de varias especies vegetales (Power & Davey, 1990). En el experimento realizado con *Jasmonium sambac* L. se incluye la purificación por gradiente osmótico añadiendo gota a gota una solución CPW con sacarosa al 21% sobre los protoplastos suspendidos en una solución CPW con manitol al 13%, de esta manera los protoplastos quedan agrupados en la interfase formada entre las dos soluciones y pueden ser retirados con facilidad (Ahmed et al., 2021).

En el estudio realizado en *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, se reportó un enfoque más innovador para la purificación de protoplastos, después del primer paso de centrifugado, los protoplastos se suspendieron en una solución de iodixanol al 65%. Esta sustancia también puede generar un gradiente de densidad discontinuo, en el cual las células aisladas surgen como una capa verde, que se recogen con una jeringa (Xu et al., 2021). Chongtham et al. (2020), menciona que el iodixanol es un compuesto con baja osmolaridad que se ha estudiado ampliamente en el aislamiento de células animales.

Cultivo de protoplastos

Para inducir la proliferación de los protoplastos aislados y la formación de colonias de microcallo, se cuenta con varios sistemas de cultivo. Por ejemplo, en el cultivo de protoplastos del guayabo (*Psidium guajava* L.) se utilizó medio de cultivo basal MS en ausencia de NH_4NO_3 , ya que se ha demostrado que la eliminación de esta sal del medio de cultivo, favorece la sobrevivencia de los protoplastos (Sauvadet et al., 1990). Por otro lado, en el caso del manzano

(*Malus domestica* Borkh) y el árbol de seda (*Albizia julibrissin* Durazz), se cultivaron en KM, medio de Kao y Michayluk (1975), que cubre las necesidades metabólicas para regenerar las paredes celulares y ha sido útil para cultivos de protoplastos de varias especies vegetales (Phillips & Garda, 2019). Asimismo, para el jasmín (*Jasminum sambac* L.) se aplicó el medio de cultivo WPM, que tiene una alta cantidad de sulfatos y se utiliza ampliamente en especies leñosas (Szabados, 1991).

Otro factor importante en el cultivo de protoplastos es la densidad de la población celular, ya que este parámetro puede afectar directamente la mitosis de las células derivadas de los protoplastos. Roca & Mroginski (1991), mencionan que este valor debe mantenerse entre 10^4 a 10^5 Pp/mL. Si la densidad celular es insuficiente, los componentes celulares solubles pueden fugarse a través de la membrana debido al volumen relativamente alto del medio de cultivo circundante y no se dividirán (Coleman et al., 2003). Y por el contrario, si la densidad es demasiado elevada, los protoplastos competirán por los nutrientes del medio y tampoco se dividirán (Castro, 2017).

Finalmente, es necesario añadir reguladores de crecimiento al medio de cultivo manteniendo un balance auxina/citoquinina que beneficie el desarrollo del callo. La mayoría de los protoplastos requieren mayor cantidad de auxinas que citoquininas para iniciar la división celular. No obstante, el tipo de reguladores de crecimiento y su concentración deben ser determinados de acuerdo a las necesidades de los protoplastos aislados, ya que un exceso de los mismos puede provocar complicaciones como la vacuolización y ruptura de los protoplastos (Szabados, 1991).

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES

- La desinfección de segmentos nodales de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) requirió un tratamiento fitosanitario con 2mL/L de SKUL-27® seguido de un tratamiento de desinfección (T3) con 2% de detergente, 70% de etanol, 4mL/L de SKULL-27® y 3% de hipoclorito de sodio, donde se consiguió anular la contaminación bacteriana y mantener la contaminación fúngica por debajo de 10% y la oxidación por debajo de 8%.
- El mejor tratamiento para el aislamiento de protoplastos de hojas cultivadas *in vitro* de arándano fue el Ta2, que consistió en celulasa 1%, macerozima 1.5% y pectinasa 0.3%, con un tiempo de incubación de 28 horas, dando como resultado 5.95×10^4 protoplastos por peso fresco de material vegetal.
- En base al análisis bibliográfico para la purificación de protoplastos se puede concluir que con un manejo adecuado de las condiciones de centrifugación seguido de un paso de separación de los protoplastos por gradiente de densidad se incrementa notablemente el rendimiento de los protoplastos obtenidos a partir de una muestra vegetal. Por otro lado, para el cultivo de protoplastos, se debe seleccionar un medio de cultivo de acuerdo a las necesidades nutrimentales de la planta de interés, también es transcendental formular una composición de reguladores de crecimiento que favorezca la proliferación de células y la regeneración de la pared celular, a través del balance auxina/citoquinina.

CAPÍTULO 7: RECOMENDACIONES

- Se recomienda evaluar el efecto de diferentes concentraciones de regulador osmótico (manitol) en el rendimiento del aislamiento de protoplastos de arándano.
- Se sugiere determinar un diseño experimental para evaluar la eficiencia de tratamientos de purificación con varias condiciones centrifugado.
- Se sugiere emplear KM, WPM y MS con ANA y 6-BAP como reguladores de crecimiento para realizar el cultivo de protoplastos de arándano.
- Se recomienda emplear las metodologías de aislamiento de protoplastos de arándano desarrolladas en este trabajo en futuras investigaciones para el mejoramiento genético de este cultivo.

Capítulo 8: BIBLIOGRAFÍA

- Abdelnour, A., & Escalant, V. (1994). *Conceptos Basicos Del Cultivo de Tejidos Vegetales* (Primera Edición).
- Abomohra, A. El-Sheekh, M., & Hanelt, D. (2016). Protoplast fusion and genetic recombination between ochromonas danica (chrysochyta) and haematococcus pluvialis (chlorophyta). *Phycologia*, 55(1), 65–71. <https://doi.org/10.2216/15-88.1>
- Agripac. (2021). *Skul-27*. Descripción de Producto SKUL 27. <https://agripac.com.ec/productos/skul-27/>
- Ahmed, M., Miao, M., Pratsinakis, E. D., Zhang, H., Wang, W., Yuan, Y., Lyu, M., Iftikhar, J., Yousef, A. F., Madesis, P., & Wu, B. (2021). Protoplast Isolation , Fusion , Culture and Transformation in the Woody Plant Jasminum spp. *MDPI*, 11.
- Amasino, R. (2005). 1955: Kinetin arrives. The 50th anniversary of a new plant hormone. *Plant Physiology*, 138(3), 1177–1184. <https://doi.org/10.1104/pp.104.900160>
- Anticona, M., Frígola, A., & Esteve, M. (2016). Determinación de polifenoles totales en arándanos y productos derivados. *Scientia* 8, 13–21.
- Aoyagi, H. (2011). Application of plant protoplasts for the production of useful metabolites. *Biochemical Engineering Journal*, 56(1–2), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.05.004>
- Azofeifa, Á. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1), 153–175.

- Baldomero, N., Yescas, A., & Morales, V. (2017). Manejo agronomico del cultivo de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) en la sierra norte de Oaxaca. *Universidad y Ciencia*, 6, 138–155
- Ballington, J. R. (2001). Collection, utilization, and preservation of genetic resources in *Vaccinium*. *HortScience*, 36(2), 213–220.
- Bastidas, O. (2008). Cell Counting with Neubauer Chamber - Basic Hemocytometer Usage. *Celeromics*, 6. www.celeromics.com
- Becerra, C., Defilippi, B., France, A., González, A., Hirzel, J., Morales, C. G., Pedreros, A., Riquelme, J., Robledo, P., & Uribe, H. (2017). Manual de manejo agronómico del arándano. *Boletín INIA*, 98.
- Brenes, A., Castillo, R., & Gómez, L. (2015). Micropropagation of Four Blueberry Cultivars. *Agronomía Costarricense*, 39(1), 7–23.
- Castro, A. (2016). Mejora de la propagación in vitro de *Vaccinium corymbosum* y evaluación de la actividad antioxidante en arándanos comerciales. *Máster En Biología Molecular, Celular y Genética.*, 40.
- Castro, C. (2017). Obtención de protoplastos del mesófilo de hojas de tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.) mediante digestión enzimática. *Universidad de Las Fuerzas Armadas*. <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/13773/1/T-ESPE-057496.pdf>
- Chakraborty, S. (2016). Protoplast Culture and Somatic Hybridization, a Promising Frontier of Plant Biotechnology. *Jast*, 02(01), 46–54.

- Chávez, R. (2019, September 24). Agricultores de Tungurahua quieren llevar al exterior el arándano. *El Telégrafo*. <https://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/regional/1/agricultores-tungurahua-arandano-hectareas>
- Chongtham, M. ., Todorov, H., Wettschereck, J. E., Gerber, S., & Winter, J. (2020). Isolation of nuclei and downstream processing of cell-type-specific nuclei from micro-dissected mouse brain regions – techniques and caveats. *BioRxiv*, 2020.11.18.374223.
- Choury, Z., Meschini, R., Dell’Orso, A., Fardusi, M. J., Mugnozza, G. S., & Kuzminsky, E. (2018). Optimized conditions for the isolation of mesophyll protoplasts along the growing season from *Arbutus unedo* and their use in single cell gel electrophoresis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 132(3), 535–543. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1349-6>
- Coleman, J., Evans, D., & Kearns, A. (2003). *Plant Cell Culture*. Taylor & Francis, 209.
- Davey, M., Anthony, P., Patel, D., & Power, B. (2010). Plant Protoplasts: Isolation, Culture and Plant Regeneration. In *Plant Cell Culture: Essential Methods* (pp. 153–171).
- Egas, M. (2018, May 31). Ecuador emprende producción de arándanos para consumo interno. *El Telégrafo*. <https://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/economia/4/ecuador-arandanos-consumo-interno>
- El-Gioushy, S. F. E. E. S., Kareem, A., & Baiea, M. H. M. (2019). Pre-isolation, isolation and regeneration protoplasts from leaf mesophyll of in vivo *malus domestica* ‘anna’ cv. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 41(4), 1–13. <https://doi.org/10.1590/0100-29452019561>

- El Herald. (2020, June 17). Talleres para conocer la producción de arándanos. *El Herald*.
<https://www.elheraldo.com.ec/talleres-para-conocer-la-produccion-de-arandanos/>
- Gamborg, O. L. (2002). Plant tissue culture. Biotechnology. Milestones. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 38(2), 84–92. <https://doi.org/10.1079/IVP2001281>
- Gómez, A., & Esquivel, A. (2013). Establecimiento in vitro de arándano (*Vaccinium corymbosum* L). *Revista Tecnología En Marcha*, 26(4), 64. <https://doi.org/10.18845/tm.v26i4.1584>
- Gordó, M. (2011). Guía práctica para el cultivo de Arándanos en la zona norte de la provincia de Buenos Aires. *Inta*, 15. www.inta.gov.ar/sanpedro
- Hernández, Y., & González, M. (2010). Establecimiento de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento in vitro de frutales perennes. *Cultivos Tropicales*, 31, 0.
- Hurkova, K., Uttl, L., Rubert, J., Navratilova, K., Kocourek, V., Stranska-Zachariasova, M., Paprstein, F., & Hajslova, J. (2019). Cranberries versus lingonberries: A challenging authentication of similar *Vaccinium* fruit. *Food Chemistry*, 284, 162–170.
- Husak, V. (2015). Copper and Copper-Containing Pesticides: Metabolism, Toxicity and Oxidative Stress. *Journal of Vasyi Stefanyk Precarpathian National University*, 2(1), 38–50.
<https://doi.org/10.15330/jpnu.2.1.38-50>
- Iliev, I., Gajdosova, A., Libiakova, G., & Mohan, S. (2010). Plant Micropropagation. In *Plant Cell Culture: Essential Methods* (pp. 1–20).

- Jiménez-Bonilla, V., & Abdelnour-Esquivel, A. (2018). Protocolo de micropropagación de arándano nativo de Costa Rica (*Vaccinium consanguinium*). *Revista Tecnología En Marcha*, 31(1), 146. <https://doi.org/10.18845/tm.v31i1.3504>
- Jiménez, V., & Abdelnour, A. (2013). Identificación y valor nutricional de algunos materiales nativos de arándano (*Vaccinium* spp). *Revista Tecnología En Marcha*, 26(2), 3. <https://doi.org/10.18845/tm.v26i2.1398>
- Kloet, S. P. Vander. (1980). The taxonomy of the highbush blueberry, *Vaccinium corymbosum* . *Canadian Journal of Botany*, 58(10), 1187–1201. <https://doi.org/10.1139/b80-148>
- Kole, C. (2011). Wild crop relatives: Genomic and breeding resources: Temperate fruits. *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Temperate Fruits, February*, 1–247. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-16057-8>
- La Hora. (2021, January 15). Ecuador: Impulsan producción de arándanos en Tungurahua. *La Hora*. <https://lahora.com.ec/tungurahua/noticia/1102338249/impulsan-produccion-de-arandanos-en-tungurahua>
- Li, N., Ding, L., Zang, Z., & Guo, W. (2014). Isolation of mesophyll protoplast and establishment of gene transient expression system in cotton. *China Crops*, 40, 231–239.
- Liu, B., Wang, K., Shu, X., Liang, J., Fan, X., & Sun, L. (2019). Changes in fruit firmness, quality traits and cell wall constituents of two highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) during postharvest cold storage. *Scientia Horticulturae*, 246, 557–562.

- Liu, J. (2005). Protoplast Isolation and Culture of Woody Plants. *Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, 553–566. https://doi.org/10.1007/1-4020-2985-3_43
- Lyons, M., Yu, C., Toma, R., Cho, S., Reiboldt, W., Lee, J., & Van Breemen, R. B. (2003). Resveratrol in raw and baked blueberries and bilberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(20), 5867–5870. <https://doi.org/10.1021/jf034150f>
- Martin, M., & Senador, V. (2019). *Análisis de la exportación de arándanos (Vaccinium corymbosum L .) frescos a Reino Unido y su comportamiento frente al Brexit . Exportation analysis of fresh blueberries (Vaccinium corimbosum L .) to the United Kingdom and its behavior against the Bre.* 30(2), 547–554.
- Michalska, A., & Łysiak, G. (2015). Bioactive compounds of blueberries: Post-harvest factors influencing the nutritional value of products. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), 18642–18663. <https://doi.org/10.3390/ijms160818642>
- Moerman, D. (1998). *Native American ethnobotany*. Timber.
- Neumann, K.-H., Kumar, A., & Imani, J. (2020). Plant Cell and Tissue Culture – A Tool in Biotechnology: Basics and Application. In *Plant Cell and Tissue Culture – A Tool in Biotechnology* (Segunda Ed). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-49098-0_7
- Ochatt, S. J., Cocking, E. C., & Power, J. B. (1987). Isolation, culture and plant regeneration of colt cherry (*Prunus avium* × *pseudocerasus*) protoplasts. *Plant Science*, 50(2), 139–143. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(87\)90150-6](https://doi.org/10.1016/0168-9452(87)90150-6)

- Ortega, L., Ramirez, M., & Iglesias, L. (2017). Perspectivas de la fusión de protoplastos en el mejoramiento genético vegetal. *Universitariao Potosinos*, 215(September).
- Patel, T., & Williamson, J. (2016). Mannitol in Plants, Fungi, and Plant–Fungal Interactions. *Trends in Plant Science*, 21(6), 486–497. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.006>
- Pervin, M., Hasnat, M. A., & Lim, B. O. (2013). Antibacterial and antioxidant activities of *Vaccinium corymbosum* L. leaf extract. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 3(6), 444–453. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(13\)60099-7](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(13)60099-7)
- Phillips, G. C., & Garda, M. (2019). Plant tissue culture media and practices: an overview. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 55(3), 242–257. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-09983-5>
- Pires, T. C. S. P., Caleja, C., Santos-Buelga, C., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2020). *Vaccinium myrtillus* L. Fruits as a Novel Source of Phenolic Compounds with Health Benefits and Industrial Applications - A Review. *Current Pharmaceutical Design*, 26(16), 1917–1928. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200317132507>
- Power, J. B., & Davey, M. R. (1990). Protoplasts of higher and lower plants : isolation, culture, and fusion. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 6, 237–259.
- Rahmani, M. S., Pijut, P. M., & Shabanian, N. (2016). Protoplast isolation and genetically true-to-type plant regeneration from leaf- and callus-derived protoplasts of *Albizia julibrissin*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 127(2), 475–488.

- Ratanasanobon, K., & Seaton, K. A. (2013). Protoplast isolation for species in the Chamelaucium group and the effect of antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) on protoplast viability. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 49(5), 593–598. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9527-7>
- Rebolledo, C. (2013). Establecimiento del arándano. In *Manual del arándano* (pp. 1–120). Centro Regional de Investigación Quilamapu.
- Retamales, J. B., & Hancock, J. F. (2018). *Blueberries* (Vol. 27). Cabi.
- Rezazadeh, R., & Niedz, R. P. (2015). Protoplast isolation and plant regeneration of guava (*Psidium guajava* L.) using experiments in mixture-amount design. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 122(3), 585–604. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0790-7>
- Rivera, A., & Jadán, M. (2010). Aislamiento, purificación y fusión de protoplastos de babaco (*V. heilbornii*) y jigacho (*V. stipulata*). *Eídos*, n. 3, 3–7. <https://revistas.ute.edu.ec/index.php/eidos/article/view/64>
- Roca, W., & Mroginski, L. (1991). *Cultivo de tejidos en la agricultura* (Primera Ed). Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Rodríguez, R. R., & Dallos, M. P. (2004). *Isolation and Cultive of Protoplast in Passion Fruit*. 9(2), 35–46.
- Romo, R., Dote, J., Garrido, H., Araneda, J., & Gil, J. M. (2019). Blueberry consumption and healthy lifestyles in an emerging market. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 17(4).

- Rubio, J. C. G., De Lena Gonzalez, G. G., & Ara, M. C. (2018). *El cultivo del arándano en el norte de España* (pp. 1–194). <http://www.serida.org/pdfs/7452.pdf>
- Sahab, S., Hayden, M. J., Mason, J., & Spangenberg, G. (2019). Mesophyll protoplasts and PEG-mediated transfections: Transient assays and generation of stable transgenic canola plants. *Methods in Molecular Biology*, 1864, 131–152. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8778-8_10
- San Martín, J. (2013). Situación varietal del arándano. In *Manual del arándano* (pp. 1–120). Centro Regional de Investigación Quilamapu.
- Saranya, S. R., Sreelekshmi, R., Siril, E. A., & Sukumaran, S. (2020). Cell and Protoplast Culture for Production of Plant Metabolites. In S. T. Sukumaran, S. Sugathan, & S. Abdulhameed (Eds.), *Plant Metabolites: Methods, Applications and Prospects* (pp. 71–88). Springer Singapore.
- Sauvadet, M.-A., Brochard, P., & Boccon-Gibod, J. (1990). A protoplast-to-plant system in chrysanthemum: differential responses among several commercial clones. *Plant Cell Reports* 1990 8:11, 8(11), 692–695. <https://doi.org/10.1007/BF00269995>
- Sharry, S., Adema, M., & Abedini, W. (2020). Plantas de probeta: Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro. *Editorial De La Universidad De La Plata*, 13–194.
- Shi, W., Lin, S., Liu, J., & Wang, E. (2007). Study on Extraction of Anthocyanins in *Vaccinium uliginosum* L. with Cellulase. *Food Science*, 11. http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-SPKX200711086.htm

- Song, G., & Hancock, J. (2011). Wild crop relatives: Genomic and breeding resources: Temperate fruits. *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Temperate Fruits*, 1–247.
- Spiers, J. M., Stringer, S. J., Draper, A. D., & Gupton, C. L. (2002). “Biloxi” Southern Highbush Blueberry. *Acta Horticulturae*, 574, 153–155.
- Suarez, I. (2020). *Cultivo de Tejidos Vegetales* (Primera Ed, Vol. 44, Issue 8). Fondo Editorial Universidad de Córdoba.
- Szabados, L. (1991). Protoplasts: aislamiento, cultivo y regeneración de plantas. *Cultivo de Tejidos En La Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Cali (Colombia): Publicación CIAT, Centro Internacional de Agricultura Tropical*, 240–270.
- Tu, Y., Xiong, L., & Leng, B. (2009). The Studies on Technique Conditions of Protoplast Isolation and Purification of Three Species of Rhododendron. *Journal of Jiangxi Normal University (Natural Sciences Edition)*, 2.
- U.S. Department of Agriculture. (2021). *Blueberries Food Data*. <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/171711/nutrients>
- USDA. (2020). *Vaccinium corymbosum Taxonomy*. Natural Resources Conservation Services. <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=VACO>
- Veberic, R., Slatnar, A., Bizjak, J., Stampar, F., & Mikulic-Petkovsek, M. (2015). Anthocyanin composition of different wild and cultivated berry species. *LWT - Food Science and Technology*, 60(1), 509–517. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.08.033>

- Xu, X., Zhu, H., Ren, Y., Feng, C., Ye, Z., & Cai, H. (2021). Efficient isolation and purification of tissue - specific protoplasts from tea plants (*Camellia sinensis* (L .) O . Kuntze). *Plant Methods*, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13007-021-00783-w>
- Yang, C. S., Landau, J. M., Huang, M.-T., & Newmark, H. (2001). Inhibition of Carcinogenesis By Dietary Polyphenolic Compounds. *Annual Review of Nutrition*, 21(1), 381–406. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.21.1.381>
- Zhou, Q., Jiang, Z., Li, Y., Zhang, T., Zhu, H., Zhao, F., & Zhao, Z. (2019). Mesophyll protoplast isolation technique and flow cytometry analysis of ancient *Platycladus orientalis* (Cupressaceae). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 43(3), 275–287. <https://doi.org/10.3906/tar-1805-62>