



Optimización de la micropropagación de dos variedades comerciales de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) utilizando la tecnología de Sistemas de Inmersión Temporal (SIT's).

Viteri Vela, Andrea Patricia

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de Titulación, previo a la obtención del Título de Ingeniera en Biotecnología

Jadán Guerrero, Mónica Beatriz Ph.D.

24 de Agosto de 2022

COPYLEAKS

Viteri Vela Andrea_Tesis.docx

Scanned on: 18:58 August 8, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	37
Words with Minor Changes	0
Paraphrased Words	270
Omitted Words	0



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

Mónica Jadán Guerrero Ph.D.
C.C. 1802278562



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación, denominado “**Optimización de la micropropagación de dos variedades comerciales de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) utilizando la tecnología de Sistemas de Inmersión Temporal (SIT’s)**” fue realizado por la señorita **Viteri Vela, Andrea Patricia**; 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 legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 09 de agosto de 2022



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

.....
Mónica Beatriz Jadán Guerrero Ph.D.

C.C.: 1802278562



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de autoría

Yo, **Viteri Vela Andrea Patricia**, con cédula de ciudadanía **No. 1727478826**, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: "**Optimización de la micropropagación de dos variedades comerciales de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) utilizando la tecnología de Sistemas de Inmersión Temporal (SIT's)**" 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, 09 de agosto de 2022


Andrea Patricia Viteri Vela

C.C: 1727478826



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, **Andrea Patricia Viteri Vela**, con cédula de ciudadanía **No. 1727478826**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: "**Optimización de la micropropagación de dos variedades comerciales de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) utilizando la tecnología de Sistemas de Inmersión Temporal (SIT's)**" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 09 de agosto del 2022

Andrea Patricia Viteri Vela

C.C: 1727478826

Dedicatoria

“Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas”

Marie Curie

Esta investigación está dedicada con mucho amor a mis padres, Patricio Viteri Nájera y Marlen Vela Alarcón, quienes desde pequeña han sido mi fuente de inspiración y superación.

A mi hermana mayor, Jenniffer Viteri Vela, quién siempre sostiene mi mano, enseñándome a no desvanecer en las adversidades de la vida.

A mi sobrina, Juliette, quién a su corta edad llena de ternura y alegría mis días.

A mi querida amiga, Gabriela Borja M., con quién comparto el regalo de la verdadera amistad.

A cada uno de mis hijos caninos, quienes fueron la compañía más dulce en mis largas noches de estudio.

Andrea Patricia Viteri Vela

Agradecimientos

Agradezco al Señor del Buen Suceso, por iluminar y bendecir mi camino sin descanso, permitiendo que forje mi vida personal y profesional.

A mis padres, Patricio y Marlen, por siempre estar presentes en cada paso de mi vida, sin dejar que me desvanezca frente a las diferentes situaciones de la vida.

A mi hermana, Jenniffer, quien siempre creyó en mí, hasta en los momentos que ni yo lo hacía.

Al Dr. Eduardo Morillo, jefe del Departamento Nacional de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Agropecuarias – INIAP, por la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo con mi proyecto de titulación.

A la Dra. Mónica Jadán, directora del Proyecto, por su asesoría durante el proyecto.

Al Ing. Santiago Meneses, Técnico del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, quien con su conocimiento y empeño guió mis primeros pasos como profesional. Al Ing. Pablo Llumiquinga, por su afable enseñanza en el manejo del programa estadístico.

A la M.Sc. Johanna Buitrón, M.Sc. Lizabeth Ojeda, Sec. Maribel Cevallos, M.Sc. Alberto Roura, M. Sc.

Álvaro Monteros, Ing. Marcelo Tacán, M. Sc. Cesar Tapia por su acogida y amistad dentro de la Institución.

A la Sra. Georgina Vera, por ser más que una amiga, quién con sus cálidas palabras de apoyo me brindó siempre su cariño y confianza.

A Gabriela Borja y Pamela Montatixe, quienes hicieron de esta aventura un recuerdo inolvidable.

Andrea Patricia Viteri Vela

Índice de Contenido

Dedicatoria.....	6
Agradecimientos	7
Índice de tablas	11
Índice de figuras.....	13
Resumen	15
Abstract.....	16
Capítulo I: Introducción	17
Antecedentes	17
Planteamiento del Problema	19
Justificación e Importancia	19
Objetivos.....	20
Objetivo General.....	20
Objetivos Específicos.....	20
Capítulo II: Marco Teórico.....	21
Generalidades	21
Vaccinium corymbosum Linnaeus	22
Morfología.....	23
Importancia de la economía del Arándano.....	24
Propagación vegetativa.....	25
Medio de cultivo	26

Factores químicos	27
Factores físicos.....	28
Sistemas de Inmersión Temporal (SIT's).....	29
Generalidades de los SIT's	29
Tipos de Sistemas de Inmersión Temporal	30
Capítulo III: Materiales y Métodos.....	43
Localización del estudio	43
Material Vegetal.....	43
Fase 1: Micropropagación de <i>Vaccinium corymbosum</i> Linnaeus en Sistemas de Inmersión Temporal (SIT's).....	44
Preparación del Medio de Cultivo Líquido.....	44
Calibración de Tiempo y Frecuencia de los SIT's-RITA.....	44
Establecimiento del Ensayo	44
Análisis Estadístico	45
Fase 2: Micropropagación de <i>Vaccinium corymbosum</i> Linnaeus en Sistema Convencional	48
Preparación del Medio de Cultivo Semisólido	48
Fase de Multiplicación	49
Análisis Estadístico	49
Capítulo IV: Resultados	52
Fase 1: Micropropagación de <i>Vaccinium corymbosum</i> Linnaeus en Sistemas de Inmersión Temporal (SIT's).....	52

	10
Coeficiente de Multiplicación	52
Longitud de Brote	58
Porcentaje de Brotes Viables	63
Porcentaje de Oxidación	68
Porcentaje de Hiperhidratación.....	73
Fase 2: Micropropagación de <i>Vaccinium corymbosum</i> Linnaeus en el Sistema Convencional.....	78
Coeficiente de Multiplicación	79
Longitud de Brote	82
Capítulo V: Discusión	86
Capítulo VI: Conclusiones y Recomendaciones	93
Conclusiones	93
Recomendaciones.....	94
Capítulo VII: Referencias	95

Índice de tablas

Tabla 1. Jerarquía taxonómica del arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i> Linnaeus)	23
Tabla 2. <i>Ubicación del Sitio Experimental</i>	43
Tabla 3. Tratamientos del ensayo de micropropagación in vitro <i>Vaccinium corymbosum</i> Linnaeus con SIT's-RITA	46
Tabla 4. ANOVA para el ensayo de micropropagación de <i>Vaccinium corymbosum</i> Linnaeus con el uso de SIT's-RITA.	48
Tabla 5. Tratamientos del ensayo de micropropagación in vitro de arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i> Linnaeus).....	50
Tabla 6. ANOVA para el ensayo de micropropagación de <i>Vaccinium corymbosum</i> Linnaeus.	51
Tabla 7. ANOVA para el coeficiente de multiplicación en la micropropagación de <i>Vaccinium corymbosum</i> Linnaeus con SIT's-RITA.....	53
Tabla 8. Prueba de Significancia y Comparación de Medias para el coeficiente de multiplicación en la micropropagación de <i>Vaccinium corymbosum</i> Linnaeus con SIT's-RITA.....	54
Tabla 9. Prueba de Significancia y Comparación de Medias, interacción de factores, para el coeficiente de multiplicación en la micropropagación de <i>Vaccinium corymbosum</i> Linnaeus con SIT's-RITA.	55
Tabla 10. ANOVA para la longitud de brotes en la micropropagación de <i>Vaccinium corymbosum</i> Linnaeus con SIT's-RITA.....	58
Tabla 11. Prueba de Significancia y Comparación de Medias para la longitud de brotes en la micropropagación de arándano en SIT's-RITA.....	59
Tabla 12. Prueba de Significancia y Comparación de Medias, interacción de factores, para la longitud de brote en la micropropagación de <i>Vaccinium corymbosum</i> Linnaeus con SIT's-RITA.	60
Tabla 13. ANOVA para el porcentaje de brotes viables en la micropropagación de <i>Vaccinium corymbosum</i> Linnaeus con SIT's-RITA.....	63

Tabla 14. Prueba de Significancia y Comparación de Medias para la proliferación de brotes viables en la micropropagación de arándano con SIT's-RITA.....	64
Tabla 15. Prueba de Significancia y Comparación de Medias, interacción de factores, la proliferación de brotes viables en la micropropagación de <i>Vaccinium corymbosum</i> Linnaeus con SIT's-RITA.....	65
Tabla 16. ANOVA para el porcentaje de oxidación en la micropropagación de <i>Vaccinium corymbosum</i> Linnaeus con SIT's-RITA.	68
Tabla 17. Prueba de Significancia y Comparación de Medias para el porcentaje de oxidación en la micropropagación de <i>Vaccinium corymbosum</i> Linnaeus con SIT's-RITA.....	69
Tabla 18. Prueba de Significancia y Comparación de Medias, interacción de factores, para el porcentaje de oxidación en la micropropagación de <i>Vaccinium corymbosum</i> Linnaeus con SIT's-RITA.....	70
Tabla 19. ANOVA para el porcentaje de hiperhidratación en la micropropagación de <i>Vaccinium corymbosum</i> Linnaeus con SIT's-RITA.....	74
Tabla 20. Prueba de Significancia y Comparación de Medias para el porcentaje de hiperhidratación en la micropropagación de <i>Vaccinium corymbosum</i> Linnaeus con SIT's-RITA.....	75
Tabla 21. Prueba de Significancia y Comparación de Medias, interacción de factores, para el porcentaje de hiperhidratación en la micropropagación de <i>Vaccinium corymbosum</i> Linnaeus con SIT's-RITA.	76
Tabla 22. <i>Análisis de varianza para el coeficiente de multiplicación in vitro de Vaccinium corymbosum Linnaeus.</i>	79
Tabla 23. <i>Prueba de significancia y medias para la micropropagación de Vaccinium corymbosum Linnaeus.</i>	80
Tabla 24. <i>Análisis de varianza para el coeficiente de multiplicación in vitro de Vaccinium corymbosum Linnaeus</i>	82
Tabla 25. <i>Prueba de significancia y medias para la longitud de brote en la micropropagación Vaccinium corymbosum Linnaeus</i>	83

Índice de figuras

Figura 1. Diseño y principio de operación de Twin – Flask.....	31
Figura 2. <i>Ilustración del sistema Ebb and Flow</i>	32
Figura 3. <i>Diseño y principio de operación del sistema RITA</i>	34
Figura 4. <i>Diseño y principio de operación del sistema Termo – photo biorreactor</i>	35
Figura 5. Diseño y principio de operación del sistema Ebb – and - Flow Híbrido.....	37
Figura 6. Diseño y principio de operación del sistema BIB.....	38
Figura 7. <i>Diseño y principio de operación del sistema Rocker</i>	39
Figura 8. <i>Diseño y principio de operación del sistema BioMINT</i>	40
Figura 9. Diseño y principio de operación del sistema de tambor giratorio	41
Figura 10. <i>Diferentes tipos de SIT's desechables y de bajo costo</i>	42
Figura 11. <i>Efecto de la densidad de siembra, tipo de explante y variedad de Vaccinium corymbosum</i> <i>Linnaeus sobre el coeficiente de multiplicación con SIT's.</i>	56
Figura 12. <i>Influencia de los Sistemas de Inmersión Temporal en el coeficiente de multiplicación de</i> <i>Vaccinium corymbosum Linnaeus.</i>	57
Figura 13. <i>Efecto de la densidad de siembra, tipo de explante y variedad de Vaccinium corymbosum</i> <i>Linnaeus en longitud de brote con SIT's.</i>	61
Figura 14. <i>Influencia de los Sistemas de Inmersión Temporal en la longitud de brotes en dos variedades</i> <i>de Vaccinium corymbosum Linnaeus.</i>	62
Figura 15. <i>Efecto de la densidad de siembra, tipo de explante y variedad de Vaccinium corymbosum</i> <i>Linnaeus en el porcentaje de brotes viables con SIT's.</i>	66
Figura 16. <i>Influencia de los Sistemas de Inmersión Temporal en el porcentaje de brotes de Vaccinium</i> <i>corymbosum Linnaeus</i>	67

Figura 17. Efecto de la densidad de siembra, tipo de explante y variedad de <i>Vaccinium corymbosum</i> Linnaeus en el porcentaje de brotes viables con SIT's.....	71
Figura 18. Influencia de los Sistemas de Inmersión Temporal en la oxidación de explantes en la micropropagación de <i>Vaccinium corymbosum</i> Linnaeus.	72
Figura 19. Efecto de la densidad de siembra, tipo de explante y variedad de arándano en el porcentaje de hiperhidratación en la micropropagación con SIT's.....	77
Figura 20. Brotes hiperhidratados encontrados en la micropropagación de <i>Vaccinium corymbosum</i> Linnaeus en SIT's	78
Figura 21. <i>Coeficiente de Multiplicación en la micropropagación Vaccinium corymbosum</i> Linnaeus en el dos sistemas de micropropagación.....	81
Figura 22. Coeficiente de Multiplicación para las dos variedades de <i>Vaccinium corymbosum</i> Linnaeus.	82
Figura 23. <i>Longitud de Brote para la micropropagación de Vaccinium corymbosum</i> Linnaeus.....	84
Figura 24. Longitud de Brotes de dos variedades de <i>Vaccinium corymbosum</i> Linnaeus	85
Figura 25. Micropropagación de dos variedades de <i>Vaccinium corymbosum</i> Linnaeus.	73

Resumen

El arándano (*Vaccinium corymbosum* Linnaeus) representa una gran potencia para la agroindustria debido a su elevada demanda y los beneficios que brinda para la salud. Sin embargo, el cultivo de tejidos vegetales por métodos convencionales no permite satisfacer la demanda insatisfecha para los agricultores. Por su parte, los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT's) han demostrado ser un método eficiente para obtener mayor proliferación de brotes en menor tiempo de cultivo con bajos costos de producción. En ese sentido, el objetivo de este estudio fue optimizar la micropropagación de dos variedades comerciales de arándano con el uso de la tecnología SIT's con los biorreactores RITA® (Recipient for Automated Temporary Immersion, por sus siglas en inglés). Donde se analizó la influencia de la densidad de siembra (5, 15 y 25 explantes por frasco RITA®) y el tipo de explante (yema apical o yema lateral). A los 40 días tras la siembra en los SIT's, se evidenció diferencias significativas para los factores densidad de siembra y variedad de arándano. Sin embargo, el factor tipo de explante no se mostró diferencias significativas en las variables de estudio. Siendo así la densidad de 15 explantes por frasco RITA® la que presentó el mayor coeficiente de multiplicación para la variedad 1 (V_1) con 8.72 brotes/explante. Mientras que para la variedad 2 (V_2) se evidenció un coeficiente de 3.88 brotes/explante. Los cuales en contraste con el sistema convencional superaron en un 57% para V_1 y 34% para V_2 . Adicionalmente, se comprobó que el genotipo de las variedades de arándano influye directamente en el crecimiento y desarrollo *in vitro* en ambas tecnologías de micropropagación.

Palabras claves: biorreactor, densidad, inmersión, líquido.

Abstract

The blueberry (*Vaccinium corymbosum* Linnaeus) represents a great potential for agribusiness due to its high demand and health benefits. However, the cultivation of plant tissues by conventional methods does not meet the unsatisfied demand for farmers. On the other hand, the Temporary Immersion Systems (SIT's) proved to be an efficient method to obtain a greater proliferation of sprouts in less cultivation time with low production costs. In this sense, the objective of this study was to optimize the micropropagation of two commercial blueberry varieties using SIT technology with RITA[®] (Recipient for Automated Temporary Immersion) bioreactors. The influence of the seeding density (5, 15 and 25 explants per RITA[®] flask) and the type of explant (apical bud or lateral bud) on the micropropagation of the two blueberry varieties in SIT's was analyzed. At 40 days after planting in SIT's, significant differences were evident for the factors planting density and blueberry variety. However, for the explant type factor, no significant differences were found in the study variables. Thus, the density of 15 explants per RITA[®] vial presented the highest multiplication coefficient for variety 1 (V1) with 8.72 shoots/explant. While for variety 2 (V2) a coefficient of 3.88 shoots/explant was evidenced. In contrast to the conventional system, these were 57% higher for V1 and 34% higher for V2. Moreover, it was found that the genotype of the blueberry varieties directly influences *in vitro* growth and development in both micropropagation technologies.

Keywords: bioreactor, density, immersion, liquid.

Capítulo I: Introducción

Antecedentes

El arándano es una especie del género *Vaccinium*, comercialmente relevante y biológicamente valioso (Ostrolucká et al., 2010). Los frutos se caracterizan por su alto contenido de vitaminas, antocianinas y otras sustancias orgánicas bioactivas con propiedades antioxidantes, antitumorales y antiinflamatorias (Ružić et al., 2012), lo que aumenta el interés de productores y consumidores alrededor del mundo (Ružić et al., 2012).

La producción de arándano posee una demanda exponencial a nivel nacional e internacional. De acuerdo con los datos del Seminario Internacional de Producción y Exportación de Arándanos, su mayor productor y consumidor es EE.UU. (González, 2018). Actualmente, este fruto traspasó las fronteras de su lugar de origen (EE. UU.) y se cultiva en otras regiones del mundo como en Sudamérica, Europa, Australia, China y Japón (Ostrolucká et al., 2007), en las que se implementaron programas de mejoramiento que permiten obtener mayor producción y frutas de alta calidad, bajo las condiciones de clima y suelos específicos de la zona (San Martín, 2013). Un ejemplo es Australia, donde la producción de arándano aumentó en un 23,9 % en la primera mitad del 2021, mientras que otros cultivos como el de las fresas disminuyó con el 6 % (Mackintosh, 2021).

Para la temporada 2020/2021 en el hemisferio sur, Perú lideró el desarrollo y exportación de arándano (Trebilcock et al., 2021). Ahora bien, la producción y exportación de frutas en Ecuador no es representativa, lo que impide ser competencia para otros países, debido a la falta de tecnificación agrícola y cumplimiento de los parámetros de calidad en el mercado internacional (Galarza, 2019). Para el año 2017, la Agrícola Oro Azul, pionera en la producción de arándanos en el país, cultivó sus primeras 3 000 plantas y alcanzó una producción de 2 800 kilos (Cárdenas, 2019).

Sumado a lo anterior, la ubicación geográfica y las condiciones ambientales del país favorecen el cultivo de arándanos. Patricio Ñacato, gerente de Biovegetal, mencionó que al seccionar los cultivos en

lotes con distinta fase vegetal (formación, desarrollo, producción y cosecha) la producción llega a anual (González, 2018). Así mismo, en el territorio nacional existe un registro de producción de arándano de origen peruano y estadounidense desde el 2015. La comercialización de estas bayas a nivel local está alrededor de \$10 el kilo, mientras que en el mercado internacional alcanza un costo de \$ 6,50 (Serrano, 2021).

La mayor parte de los cultivares de arándano se propagan vegetativamente por esquejes de madera blanda o dura (Debnath, 2008). No obstante, este método no llega a ser satisfactorio, puesto que las tasas de enraizamiento y crecimiento de brotes suelen ser erráticas (Sedlak & Paprstein, 2009). Así pues, la micropropagación produce un alto número de plántulas clonales con características idénticas, lo que la convierte en un principal método para producir arándanos libres de virus para los cultivos (Guo et al., 2019).

En las últimas tres décadas se utilizaron yemas axilares y regeneración de brotes adventicios para la proliferación de brotes, y los resultados variaron por la eficacia del medio de cultivo y la morfogénesis de *Vaccinium in vitro* (Sedlak & Paprstein, 2009). Rodríguez y Morales (2015), quienes evaluaron la propagación *in vitro* de dos variedades de arándano bajo la variación de dos factores: densidades de explantes y volúmenes de medio de cultivo, concluyeron que para el coeficiente de multiplicación de la variedad “Brigitta” el volumen de medio de cultivo no influyó en la tasa de proliferación, pero sí las densidades de siembras altas. Y para el caso de “Legacy” en volúmenes intermedios y densidades bajas alcanzó el máximo número de brotes por explante.

La micropropagación de *Vaccinium corymbosum* Linnaeus en SIT's con medio de cultivo líquido genera una alta producción de plantas y reduce los costos de producción (Paek et al., 2005). Con base en lo anterior, se desarrollaron varias investigaciones en este campo, por ejemplo, Clapa et al. (2019) utilizaron Plantform, un tipo de biorreactor, para el desarrollo de un protocolo de micropropagación para la variedad “Duke”. Con lo cual evidenciaron una influencia del volumen del medio de cultivo en el

coeficiente de multiplicación y en la longitud de brotes de los explantes. Por otro lado, Debnath (2009) usó sistemas de inmersión de tipo RITA® para la proliferación de brotes de tres genotipos de *Vaccinium angustifolium* Ant. lo que logró aumentar la tasa de proliferación en comparación con el medio de cultivo gelificado, además, observó que la respuesta del explante varía en función del genotipo. Estos resultados son similares a lo que informó Debnath (2017), quien utilizó dos tipos de biorreactores: biorreactor estacionario (BE) y SIT's, con ocho genotipos de *Vaccinium*.

Planteamiento del Problema

El arándano se convirtió en una de las bayas más cotizadas tanto a nivel nacional como internacional, debido a sus excelentes características organolépticas y nutritivas. Su escasa producción ha impedido la tecnificación del cultivo de esta especie en la sierra ecuatoriana y generó una demanda insatisfecha para cierto nicho del mercado nacional. Por su parte, las técnicas de cultivo *in vitro* tradicionales aplicadas en arándano permitieron obtener tasas altas de multiplicación y plantas libres de enfermedades y virus. Sin embargo, se hace necesario buscar metodologías que permitan incrementar los rendimientos y reducir costos de producción sin afectar la calidad de las plantas, con el fin de satisfacer la alta demanda de esta especie en el mercado nacional.

En este orden de ideas, el presente proyecto tuvo como objetivo optimizar la micropropagación *in vitro* de dos variedades de arándano comerciales por medio de los SIT's, de modo que se obtenga una producción masiva de *in vitro* plantas con bajos costos de producción. De esta manera, se logra desarrollar una metodología que sea económicamente viable para implementar de forma comercial en el país en un futuro cercano.

Justificación e Importancia

El cultivo de arándano en el Ecuador es relativamente nuevo, pues sus comienzos datan del año 2015, es decir, se desarrolló durante siete años dentro del país. En los últimos años, el aumento de la

demanda de arándano despertó el interés de ciertos sectores agrícolas que buscan expandir las áreas de cultivo de esta especie en la sierra ecuatoriana, la cual permite mantener una producción continua de estas bayas durante todo el año gracias a sus condiciones climáticas y demográficas. A su vez, esto conlleva a la necesidad de proporcionar material vegetal de calidad para su propagación.

La demanda insatisfecha de arándano dio lugar al desarrollo de proyectos enfocados en una mayor producción de plantas a bajos costos. El uso de tecnologías, como los SIT's, permiten automatizar la etapa de multiplicación. La información sobre el uso de estos sistemas es muy amplia para diferentes variedades de *Vaccinium* alrededor del mundo, con ventajas como la proliferación masiva de brotes libres de enfermedades y virus, reducción de costos y disminución de mano de obra. No obstante, en el país existe una escasa aplicación de esta tecnología con propósitos comerciales. El uso de estos sistemas permitiría generar una producción masiva de plantas en menor tiempo, lo que proporciona a los agricultores una alternativa sustentable para diversificar los cultivos e incrementar los ingresos.

Objetivos

Objetivo General

Optimizar la micropropagación de dos variedades comerciales de arándano (*Vaccinium corymbosum* Linnaeus) utilizando la tecnología de Sistemas de Inmersión Temporal (SIT's).

Objetivos Específicos

- Evaluar la densidad de siembra y tipo de explante apropiado con el tiempo y frecuencia de inmersión establecida para la micropropagación *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* Linnaeus utilizando Sistemas de Inmersión Temporal.
- Comparar las tasas de multiplicación de *Vaccinium corymbosum* Linnaeus de los Sistemas de Inmersión Temporal con relación al método de micropropagación *in vitro* en medio semisólido.

Capítulo II: Marco Teórico

Generalidades

El género *Vaccinium*, perteneciente a la familia Ericaceae, está conformado por 450 especies aproximadamente (Debnath & Goyali, 2020; Kole, 2011). El 35% de estas son de origen americano, de las cuales el 25% pertenecen al norte del continente y el 10% son del centro y sur de América (Brenes et al., 2015). Estas especies se han distribuido en las laderas montañosas de los trópicos, regiones subtropicales, templadas y boreales del hemisferio norte (Debnath & Goyali, 2020). El arándano se domesticó desde 1950 en Norteamérica (Callwood et al., 2021) y se introdujo en varias regiones alrededor del mundo como Europa, Sudamérica, Australia, Japón, Chile, Argentina y Uruguay (Lim, 2016).

Varias de las especies de *Vaccinium* sobresalen económicamente, por ejemplo, el arándano de arbusto bajo (*V. angustifolium*, *V. boreale*, *V. myrtilloides* y *V. pallidum*), el arándano de arbusto alto del norte (*V. corymbosum* Linnaeus), arbusto alto del sur (*V. darrowii*) y el arándano de ojo de conejo (*V. ashei*) (Rodríguez-Saona et al., 2019). La resistencia a bajas temperaturas y alta calidad de fruto hacen que el arándano de arbusto alto sea la especie más cultivada a nivel mundial (Rashidinejad, 2020).

El arándano es considerado como un “alimento funcional” gracias a sus principales constituyentes bioactivos (Smrke et al., 2021). En su contenido nutricional se destacan componentes esenciales como proteínas, fibras dietéticas, grasas y carbohidratos (Nadulski et al., 2019). Además, poseen una amplia gama de ácidos orgánicos y fenólicos que proporciona actividades antioxidantes (Debnath & Goyali, 2020). Varios estudios han determinado que el consumo a largo plazo de arándano tiene efectos antiinflamatorios y brinda protección frente al cáncer, enfermedades cardiovasculares, accidentes cerebrovasculares, presión arterial alta y osteoporosis (Del Bo’ et al., 2013; Kalt, 2006; Samad et al., 2014; Smrke et al., 2021).

***Vaccinium corymbosum* Linnaeus**

Vaccinium corymbosum Linnaeus, conocida como Highbush blueberry, es considerada una de las especies más importante dentro de su género, abarcando el 85% de los cultivos de estas bayas alrededor del mundo (García et al., 2013; Lim, 2012). Las variedades de arándanos de arbusto alto se caracterizan por sus frutos grandes con aromas agradables e ideales para su consumo en fresco (Hirvi & Honkanen, 1983; Lim, 2012). En los últimos 30 años, la demanda por estas bayas ha aumentado debido a la expansión del mercado (Cappai et al., 2020).

En el Ecuador se cultivan dos variedades pertenecientes a la especie *Vaccinium corymbosum* Linnaeus. La variedad Biloxi, que soporta las condiciones climáticas de la línea ecuatorial y puede crecer hasta altitudes de 2 800 metros sobre el nivel del mar (González, 2018). La producción de esta variedad es temprana por lo que se puede ver afectada por heladas. Además, su fruto se caracteriza por ser de tamaño mediano, firme y de sabor exquisito (Undugarraga & Vargas, 2013). Y, la variedad Emerald, nativa de Florida, que requiere de 250 horas de frío para su crecimiento (Galarza, 2019). Se destaca por ser una planta vigorosa y productiva, con un fruto firme de color azul claro y de excelente sabor (Undugarraga & Vargas, 2013).

Distribución Geográfica y Taxonomía

Vaccinium corymbosum Linnaeus se desarrolla en un nicho bioclimático, donde las temperaturas fluctúan entre los 7 y 33°C, sin embargo, su crecimiento óptimo se alcanza en el rango de 16 a 25°C (Meléndez et al., 2021). El arándano demanda un periodo de frío acumulado de 650 – 850 horas bajo 7°C para favorecer la floración y disminución de la caída de yemas florales (Muñoz et al., 1988). Su desarrollo y crecimiento se da a los 1 500 y 4 700 metros sobre el nivel del mar, en suelos arenosos, franco arenoso o arcillosos con pH entre 4,0 – 5,0 (Ormazábal et al., 2020). La mayoría de las regiones donde se cultiva arándano mantienen programas de mejoramiento, con la finalidad de aumentar la

producción y calidad de la fruta, bajo las condiciones de clima y suelos de cada zona (Undugarraga & Vargas, 2013).

En la Tabla 1, se detalla las características taxonómicas del arándano (*Vaccinium corymbosum* Linnaeus).

Tabla 1.

Jerarquía taxonómica del arándano (Vaccinium corymbosum Linnaeus)

Taxo	Descripción
Reino	Plantae
Subreino	Viridiplantae
Infrareino	Streptophyta
Superdivisión	Embriofita
División	Tracheophyta
Subdivisión	Sppermatophytina
Clase	Magnoliopsida
Superorden	Asteranae
Orden	Ericales
Familia	Ericaceae
Género	<i>Vaccinium</i>
Especie	<i>corymbosum</i> Linnaeus

Nota. Tomado de *Vaccinium corymbosum* Linnaeus, por Integrated Taxonomic Information System (ITIS).

Morfología

El arándano presenta una raíz primaria para almacenamiento y anclaje, y raíces secundarias para la absorción de nutrientes (Gough, 1994). Sus tallos se caracterizan por ser delgados y nervudos, los cuales alcanzan los dos metros de altura (Meléndez et al., 2021). Las hojas pueden ser caducas o perennes con nervadura pinnada, así mismo, su tamaño puede variar entre 5 a 7 cm de largo y 0.5 a 3.5

cm de ancho (Zhou, 2015). Adicionalmente, se distribuyen de manera alterna a lo largo de la rama y su forma varía de ovada a lanceolada con pilosidad en el envés (Muñoz et al., 1988).

Por su parte, las flores son pedunculadas de ovario ínfero con cuatro a cinco lóculos capaces de contener 20 a 30 óvulos con placentación axial. Los estambres se originan desde la base de la corola y acaban rodeando al estilo en su totalidad (Muñoz et al., 1988). Sus pétalos blancos forman una corola tubular que cuelga con su extremo abierto hacia abajo (Prodorutti et al., 2007). Ahora bien, el fruto se caracteriza por no tener hueso formado a partir de un ovario superior fertilizado (Cappai et al., 2018). El endocarpio se forma por cinco capelos con diez lóculos y cinco placentas lignificadas donde se pueden hallar de 10 a 65 semillas (Blaker & Olmstead, 2014). Culminado su estado de madurez los colores de las bayas se van tornando morados y presentan secreciones de cera (Bustillo, 2018).

Importancia de la economía del Arándano

Estados Unidos es el mayor productor y consumidor de arándano en el mundo, con una producción de 300 000 toneladas y consumo de 1,10 lb per cápita al año (Meléndez et al., 2021). En el año 2021, Perú se convirtió en el principal proveedor de arándanos para Estados Unidos con 84 172 toneladas por \$ 560 millones de dólares (Trebilcock et al., 2021). En la última década, se evidenció un rápido crecimiento de la producción de esta especie en Argentina, México, Sudáfrica y España (Rodríguez-Saona et al., 2019).

La producción de arándano se destina al mercado de productos frescos, por ende las bayas con alta calidad y longevidad poscosecha tienen mayor demanda (Rodríguez-Saona et al., 2019). Su principal uso es en la industria de mermeladas, confituras y tisanas, no obstante, en la cosmética se destaca el uso de los frutos secos, raíces, flores y hojas de arándano (Diktaş et al., 2021).

Propagación vegetativa

La propagación vegetativa es el proceso por medio del que se obtienen plantas genéticamente idénticas a su progenitor (Miller et al., 2006). Tradicionalmente el arándano se propaga mediante semillas, esquejes de madera blanda o dura y divisiones de rizoma. Esto dependerá de la etapa de desarrollo y edad vegetal (Debnath & Arigundam, 2020).

Así mismo, las técnicas de propagación tradicionales presentan ciertas desventajas. Por un lado, la propagación de arándano por estacas genera índices de enraizamiento bajos, lo que provoca pérdidas en campo (Mora, 2010); mientras que la propagación por semilla produce una progenie que difiere de la planta madre, frutos heterogéneos y una producción que dura de cinco a diez años (Chicaiza, 2021).

Cultivo de tejido vegetal in vitro

El cultivo de tejido vegetal es una herramienta que permite obtener plantas clonales en condiciones asépticas y bajo un ambiente controlado, a partir de un explante, como célula, tejido, órgano o una planta completa (Hoy et al., 2003; Hussain et al., 2012). Los explantes que más se utilizan son los meristemas apicales, brotes apicales y laterales, meristemas y yemas flores, discos de hojas, tallos, embriones cigóticos inmaduros, suspensión celular y callos (Ahloowalia et al., 2004). Este proceso es continuo con períodos y espacios relativamente cortos (Hussain et al., 2012).

Por su parte, la totipotencia y plasticidad celular son fundamentales para el desarrollo del cultivo de tejidos vegetales (García et al., 2010). El alemán Haberlandt introdujo el término “totipotencia celular” en 1902, y lo definió como el potencial que conserva una célula para desarrollar un organismo completo (Verdeil et al., 2007; Xu et al., 2019). En contraste, la plasticidad celular es la capacidad que tienen las células para los procesos de multiplicación, división, diferenciación y formación de un nuevo organismo (García et al., 2010).

Medio de cultivo

El medio de cultivo es la combinación de todos los nutrientes y vitaminas que posibilitan el crecimiento y desarrollo óptimo de la planta (Hussain et al., 2012). Los principales componentes de los medios de cultivo son sales minerales (macro y micronutrientes), fuente de carbono (azúcar) y agua. Se pueden incluir otros componentes como vitaminas, reguladores de crecimiento o agente gelificante. Cabe mencionar que la composición del medio de cultivo cambiará proporcionalmente dependiendo de la etapa del cultivo y la especie de planta (Prakash et al., 2012).

Ahora bien, el medio de cultivo más apto para la proliferación de brotes de arándano es “Woody Plant Medium” (WPM, por sus siglas en inglés), el cual desarrollaron Lloyd y McCown en 1980 (Rodríguez & Morales, 2015). A diferencia de otros medios de cultivos, este se diseñó especialmente para equilibrar la sensibilidad a la sal de ciertas especies leñosas (Beyl, 2004).

Por su parte, el medio de cultivo semisólido se destaca por contener un agente solidificante en su composición, que permite la ligera incrustación de los explantes. La concentración del agente gelificante oscila entre 0.5 – 1 % y posibilita la difusión de nutrientes por los tejidos (Bhatia, 2015). Su uso para la proliferación comercial de plantas presenta desventajas como bajas tasas de multiplicación, alto costo de mano de obra y necesidad de espacio (AlKhateeb & Alturki, 2014).

Así mismo, el medio líquido se caracteriza por la ausencia de agentes gelificantes, y estos se destinan principalmente para el cultivo automatizado y la reducción de costos en la etapa de multiplicación (Aguilar et al., 2019). Para el desarrollo de las plantas en medio de cultivo líquido se requiere una tasa de oxigenación adecuada, que son proporcionadas por sistemas de agitación (Beyl, 2004).

Factores químicos

En concordancia con la Asociación Internacional de Fisiología Vegetal (IAPP, por sus siglas en inglés), los macronutrientes son aquellos elementos que se encuentran en concentraciones mayores a $0.5 \text{ mM} \cdot \text{L}^{-1}$. Los elementos esenciales para el óptimo crecimiento y morfología de las plantas, son el carbono, hidrógeno y oxígeno, también se pueden encontrar nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre (Hussain et al., 2012).

Los micronutrientes, a diferencia de los anteriores, se encuentran en concentraciones inferiores a $0.5 \text{ mM} \cdot \text{L}^{-1}$. Algunos de estos elementos son el hierro, zinc, boro, manganeso, cobre y molibdeno. El hierro presenta dificultad en disolverse o precipitarse al ser utilizado como sales de citrato o tartarato en el medio de cultivo (Hussain et al., 2012).

Por su parte, la fuente de carbono tiene efecto en el crecimiento y en la morfogénesis, y su potencial osmótico influye en la tasa de división celular (Yaseen et al., 2013). La sacarosa se convirtió en la fuente de carbono más utilizada en el medio de cultivo, con concentraciones entre 2 a 5% (Hussain et al., 2012), gracias a su disponibilidad y bajo costo (Desjardins et al., 1995).

Los reguladores de crecimiento participan en los procesos de desarrollo de la planta como la germinación, elongación del tallo, crecimiento y desarrollo tanto de hojas como de frutos, y floración. Sus concentraciones varían según el tiempo, la estación o la etapa de desarrollo (Gaba, 2005) y pueden ser activos en un lugar diferente de aquel en el que se producen (Ibrahim et al., 2008).

Por otro lado, las citoquininas estimulan la división celular y liberación de la latencia de yemas laterales (Gaspar et al., 1996). En la micropropagación de arándanos, estos reguladores son claves para el desarrollo y crecimiento de la especie. La zeatina y la 2-isopenteniladenina demostraron ser eficientes para este tipo de bayas (Orsolya et al., 2019).

Otro complemento del medio de cultivo son las vitaminas, cuyas concentraciones cambian según la especie y el tipo de cultivo. Las vitaminas que más usan son la tiamina, el ácido nicotínico, la piridoxina y el mio-inositol, que forman parte del medio basal Murashige y Skoog (1962) (Abrahamian & Kantharajah, 2011).

A su vez el agente gelificante es el soporte del tejido vegetal, por lo tanto, existe una parte aireada del explante y una sumergida, sin embargo, al estar en contacto directo con los explantes debe cumplir el requisito de ser inerte (Bhojwani & Dantu, 2013). Por último, el agar es el agente solidificante que más se utiliza, esto se debe a su estabilidad, la alta claridad y resistencia al metabolismo (Kaçar et al., 2010).

Factores físicos

La fisiología de la planta madre influye en el desarrollo *in vitro* del explante introducido. Los tejidos más jóvenes poseen mayor cantidad de células que se dividen activamente (Molnár et al., 2011), mientras que, la capacidad de regeneración disminuye al aumentar la edad de la planta madre (Bidabadi & Mohan Jain, 2020).

Cabe resaltar que la luz controla el crecimiento y desarrollo de la planta (George et al., 2008). El crecimiento de las plantas *in vitro* cuenta con tres características: la longitud de onda, la densidad de flujo y duración de exposición (Gupta et al., 2020). Así mismo, la respuesta androgénica se puede ver afectada por la combinación entre la luz y la temperatura. La exposición a períodos alternos entre luz y oscuridad puede beneficiar a algunas especies, mientras que, para otras las condiciones de cultivo continuas, ya sea solo luz u oscuridad, son más favorables (Gaba, 2005).

El cultivo *in vitro* consiste en un sistema cerrado en donde puede existir intercambio de gases. No obstante, ciertos componentes gaseosos, como el dióxido de carbono, el oxígeno y etileno, pueden afectar los tejidos vegetales de manera positiva o negativa dependiendo de la especie (Kumar & Reddy,

2011). Por otro lado, la humedad relativa dentro del recipiente puede oscilar entre 98 y 100%. Los altos niveles de este factor se deben al agua retenida en la superficie del tejido y en las paredes del recipiente (Teisson & Alvard, 1995).

El medio de cultivo normalmente se ajusta a un pH, que permita la absorción óptima de nutrientes. Se sugirió que el pH sea entre 5.5 a 6.0, sin embargo, este depende de la especie de la planta y el objetivo del estudio. El ajuste de este parámetro se lo realiza con soluciones diluidas de una base o ácido (Shi et al., 2017).

Sistemas de Inmersión Temporal (SIT's)

Los SIT's son tecnologías que se diseñaron para el cultivo intensivo de plántulas clonales mediante la regulación de factores nutricionales y físicos (Debnath, 2011). Estos se caracterizan por tener un sistema de control automático computarizado que posibilita el control de diferentes condiciones como la agitación, temperatura, oxígeno disuelto entre otras. Los biorreactores se pueden clasificar en cuatro tipos: fase líquida, fase gaseosa, SIT's e híbridos (Georgiev et al., 2014).

Generalidades de los SIT's

Los SIT's son sistemas automatizados sencillos, que se desarrollaron con la capacidad de proveer un ambiente óptimo, mejorar la transferencia de gases y nutrientes, y preservar la integridad morfológica de los segmentos de plantas cultivadas *in vitro* (Steinmacher et al., 2011). Estos sistemas intentan proporcionar un ambiente natural a los explantes sembrados en medio líquido dentro del recipiente de cultivo y expuestos a un ambiente gaseoso (Steingroewer et al., 2013). Usualmente, se diseñan con recipientes de vidrio o plástico transparentes, de tal forma, que la luz externa ilumina los explantes (Yang et al., 2010).

Además, los SIT's pueden ser semiautomáticos periódicos o completamente automatizados, y se basan en ciclos alternos de inmersión de los explantes sembrados dentro del medio líquido durante

unos pocos minutos, seguido del drenaje y exposición del tejido vegetal al ambiente gaseoso por algunas horas (Steinmacher et al., 2011). El ajuste adecuado de las duraciones de inmersión y exposición, crea condiciones óptimas para la humedad y el suministro de nutrientes, así pues, evita la hiperhidratación de los explantes (Albarrán et al., 2005).

Es importante resaltar que la exposición directa del tejido vegetal al ambiente gaseoso reduce el transporte interfásico de oxígeno desde la forma gaseosa a los explantes cultivados, a diferencia de la inmersión de los cultivos, donde el transporte interfásico de oxígeno enfrenta la resistencia de algunas capas límite (Curtis & Tuerk, 2008). Por ende, perfeccionar el transporte de oxígeno mejora el intercambio gaseoso, reduce las limitaciones de oxígeno y evita la asfixia. En este sentido, muchos SIT's tienen la opción de enriquecimiento con dióxido de carbono (CO₂) durante el periodo de exposición, la cual mejora significativamente la multiplicación, actividad fotosintética y acumulación de metabolitos secundarios (Aragón et al., 2010).

Adicionalmente, los SIT's no cuentan con un sistema de agitación mecánica, en su lugar, el cambio de los explantes depende netamente de las fuerzas hidrodinámicas que se producen durante el período de inmersión (Steinmacher et al., 2011). De esta manera, los cultivos de plantas mantienen su integridad celular y también mejoran su morfología y fisiología (Afreeen, 2008).

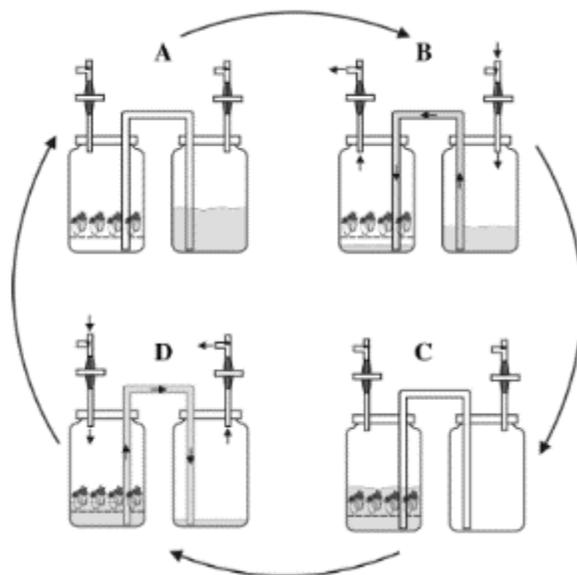
Tipos de Sistemas de Inmersión Temporal

Twin-Flask. Es un SIT que consiste en dos tipos de contenedores conectados por medio de una manguera en forma de U (Dewanti et al., 2016). Uno de los contenedores actúa como la cámara de cultivo, que puede contener o no, un soporte para los explantes; mientras que, el otro es el lugar de almacenamiento del medio. Los dos contenedores están conectados a sus propias líneas de aire presurizado (Scherer et al., 2013).

El simple diseño de este tipo de SIT facilita su uso y la construcción permite mantener esterilidad por largos períodos (Arencibia et al., 2013). No obstante, este diseño requiere de dos relojes independientes, electroválvulas de tres vías, carece de opciones para la renovación del medio de cultivo y posee una ventilación forzada. Por otro lado, este tipo de sistemas carecen de un puerto especializado para el suplemento de CO₂ externo durante el período de exposición (Quiala et al., 2011). En la Figura 1 se puede apreciar el diseño y principio de operación del tipo de sistema Twin – Flask.

Figura 1.

Diseño y principio de operación de Twin – Flask



Nota. A) Período de exposición. B) Paso del medio desde el tanque de almacenamiento a la cámara de cultivo. C) Período de inmersión. D) Paso del medio de cultivo desde la cámara de cultivo al tanque de almacenamiento. Tomado de Temporary immersion systems in plant biotechnology por Georgiev et al., 2014.

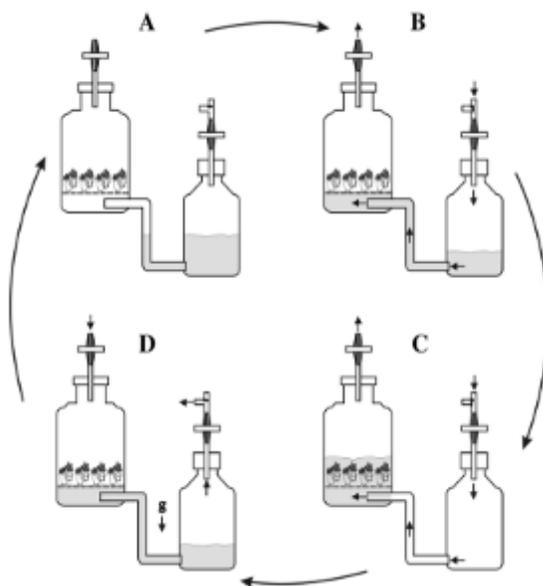
Ebb – and – Flow. Este tipo de SIT consta de dos frascos: uno de boca amplia que actúa como la cámara de cultivo, donde los explantes se ponen sobre un soporte de poliuretano, el cual ayuda a

mantener la humedad durante el período de exposición y tiene la función de rociar aire durante la etapa de inmersión (Ducos et al., 2008). Y uno pequeño que obra como tanque de almacenamiento de medio ubicado debajo del tanque de cultivo. Ambos están conectados por un puerto que se sitúa debajo en la parte inferior (Ducos et al., 2007).

Estos sistemas son sencillos y de confiable construcción, con una automatización simplificada y menor consumo de energía. Aunque, no cuenta con una distribución de luz uniforme dentro de la cámara de cultivo, carece de ventilación forzada y enriquecimiento de CO₂ (Scheidt et al., 2009). En la Figura 2, se ilustra el diseño y principio de operación del tipo de sistema Ebb and Flow.

Figura 2.

Ilustración del sistema Ebb and Flow



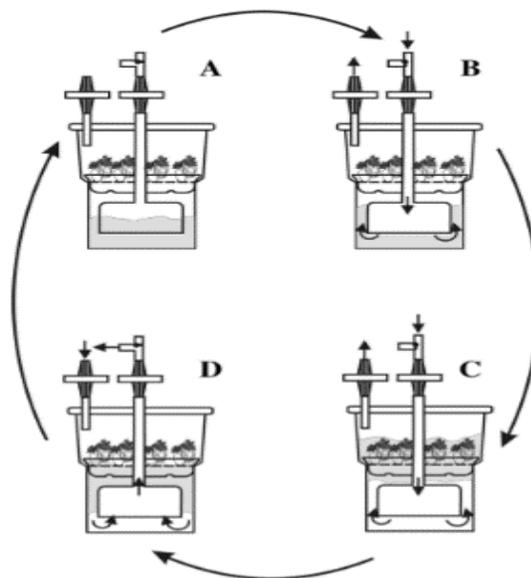
Nota. A) Período de exposición. B) Paso del medio desde el tanque de almacenamiento a la cámara de cultivo mediante la aplicación de presión de aire. C) Período de inmersión. D) Paso del medio de cultivo desde la cámara de cultivo al tanque de almacenamiento debido a la gravedad. Tomado de Temporary immersion systems in plant biotechnology por Georgiev et al., 2014.

Recipient for Automated Temporary Immersion (RITA). Este tipo de sistema abarca en un único frasco autoclavable de polipropileno con dos compartimentos separados por una bandeja con un soporte de malla y un tubo plástico en el centro. El compartimiento superior corresponde a la cámara de cultivo y el inferior al tanque de almacenamiento de medio (Mordocco et al., 2009). Así mismo, cuenta con una tapa rosca ancha para cerrar el frasco, el cual está equipado con puertos externos centrales y laterales. Los puertos laterales están asegurados con filtros de membrana, mientras que, el puerto central está conectado a la línea de aire controlada por un reloj y una electroválvula de tres vías (Georgiev et al., 2014).

El sistema RITA posee una operación simple y confiable, un espacio compacto para la acomodación del sistema y el soporte de un nivel de humedad suficiente con la separación total de los explantes y el medio líquido, pero carece de habilidad para la renovación del medio de cultivo, opciones para ventilación forzada y enriquecimiento del CO₂ (Mordocco et al., 2009). El diseño y principio de operación del sistema RITA se detalla en la Figura 3.

Figura 3.

Diseño y principio de operación del sistema RITA



Nota. A) Período de exposición. B) Paso del medio desde el tanque de almacenamiento a la cámara de cultivo mediante la aplicación de presión de aire a través del tubo central. C) Período de inmersión. D) Paso del medio de cultivo desde la cámara de cultivo al tanque de almacenamiento debido a la gravedad. Tomado de Temporary immersion systems in plant biotechnology por Georgiev et al., 2014.

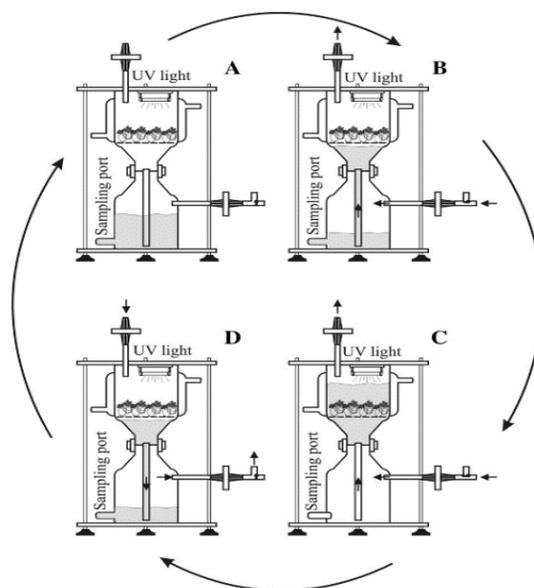
Termo – photo biorreactor. Este tipo de biorreactor se diseñó para la micropropagación de la especie *Deschampsia antarctica* E.Desv. Consta de dos frascos de vidrio Pírex conectados por tuberías de acero inoxidable (Rodrigues et al., 2006). El frasco superior corresponde a la cámara de cultivo, la cual se encuentra equipada con una chaqueta de agua que mantiene la temperatura y una fuente de luz UV en la tapa. El material vegetal se pone sobre una pantalla de acero inoxidable. El frasco inferior representa al tanque de almacenamiento de medio de cultivo, que cuenta con dos puertos externos: el

superior para el suministro de aire; y el inferior para cargar el medio y las muestras (Navarro et al., 2013).

Una de las principales ventajas de este sistema es la capacidad para controlar la temperatura y la radiación UV, principalmente en plantas extremófilas. No obstante, su construcción es costosa y complicada (Sequeira et al., 2012). En la Figura 4 se detalla el diseño y principio de operación del sistema Termo – photo biorreactor.

Figura 4.

Diseño y principio de operación del sistema Termo – photo biorreactor



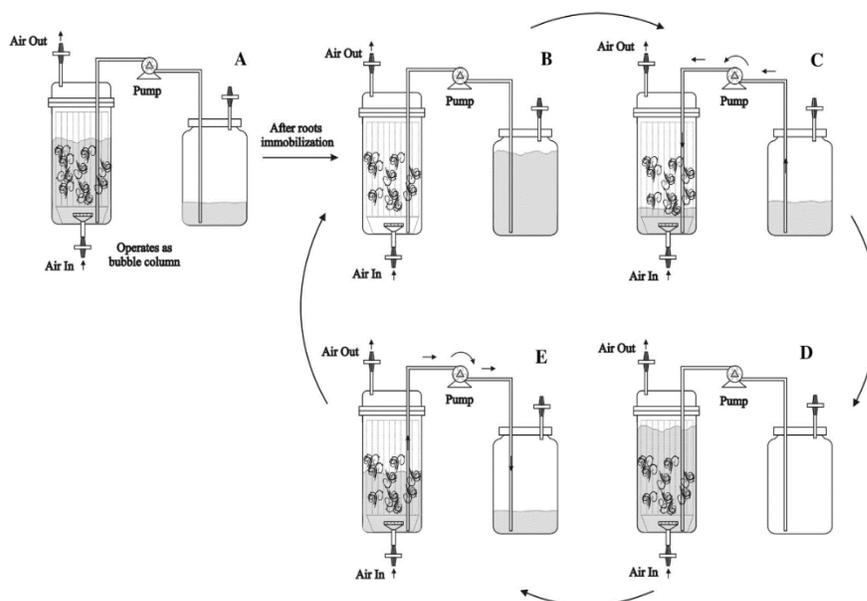
Nota. A) Período de exposición. B) Paso del medio desde el tanque de almacenamiento a la cámara de cultivo mediante la aplicación de aire en el taque de almacenamiento de medio de cultivo. C) Período de inmersión. D) Paso del medio de cultivo desde la cámara de cultivo al tanque de almacenamiento debido a la gravedad. Tomado de Temporary immersion systems in plant biotechnology. Georgiev et al., 2014.

Ebb – and - Flow Híbrido. A diferencia del sistema Ebb and Flow común, aquí se forma un flujo convectivo tubular, que permite cultivar altas densidades de raíces peludas (Cuello & Yue, 2008). En los primeros días tras la siembra, este actúa como una columna de burbujas, con el fin de asegurar la distribución uniforme e inmovilización de las raíces peludas en una malla interna de soporte; luego obra como un sistema Twin – Flask (Uozumi, 2004). La bomba peristáltica se utiliza para el paso del medio desde el tanque de almacenamiento a la cámara de cultivo y viceversa. Los períodos de inmersión y exposición son cortos, la velocidad de la bomba asegura el paso del medio en un minuto, con lo que se logra el flujo convectivo tubular (Cuello & Yue, 2008).

Además, se suplementa con aire presaturado, de tal forma que puede suministrar oxígeno a las zonas internas de las raíces. Este sistema permite la transferencia de oxígeno durante el cultivo de altas densidades de biomasa. Sin embargo, el diseño es complejo, su uso se limita a la siembra de raíces y la cosecha de biomasa inmovilizada también es complicada (Mehrotra et al., 2018). El diseño y principio de operación del sistema Ebb - and – Flow Híbrido se evidencia en la Figura 5.

Figura 5.

Diseño y principio de operación del sistema Ebb – and - Flow Híbrido.

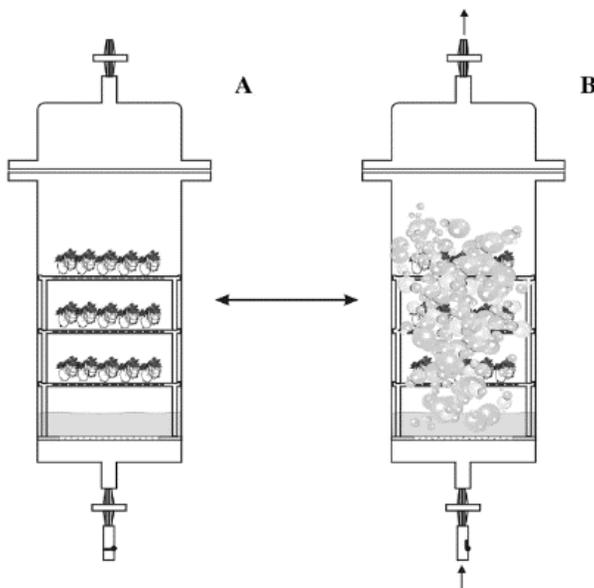


Nota. A) Operación como columna de burbujas B – E) Operación como un sistema Twin - Flask. Tomado de Temporary immersion systems in plant biotechnology por Georgiev et al.,2014.

Biorreactor de Inmersión por Burbujas (BIB). En este sistema la etapa de inmersión se realiza en medio de cultivo líquido con detergente para la formación de espuma (Adelberg & Toler, 2004). Está formado por un único cilindro de vidrio y dividido en dos compartimentos mediante una lámina de microporos. La cámara superior corresponde a la de crecimiento donde rejillas de acero inoxidable soportan los explantes (Paek et al., 2005). El medio líquido con detergente se llena en el fondo de la cámara de crecimiento, mientras que, la cámara baja se utiliza para la distribución uniforme de aire. Este sistema presenta mejor crecimiento y altos número de brotes por explante en comparación con el sistema RITA (Scheidt et al., 2009). Aun así, la presencia de detergente puede ser contraproducente para ciertos explantes sensibles (Paek et al., 2005). En la Figura 6 se expone el diseño y principio de operación del sistema BIB.

Figura 6.

Diseño y principio de operación del sistema BIB



Nota. A) Período de exposición B) Período de inmersión en donde el aire es suministrado y se forman la espuma. Tomado de Temporary immersion systems in plant biotechnology por Georgiev et al. 2014.

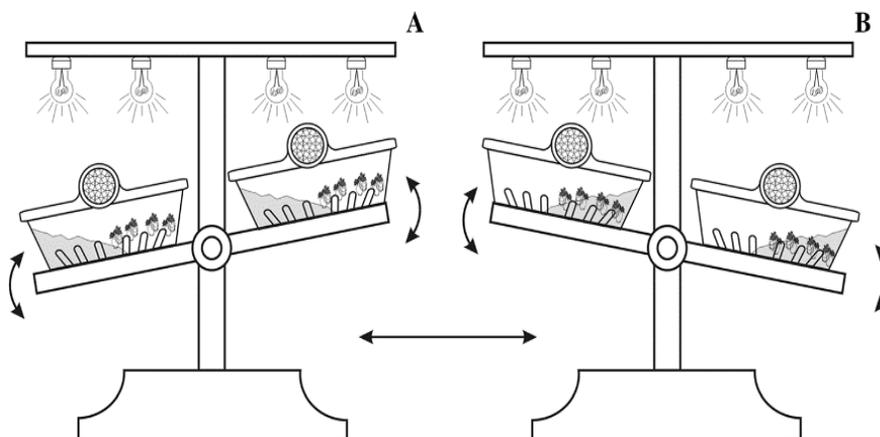
Sistemas Rocker. En este sistema se utiliza una plataforma metálica para inclinar los frascos de cultivo a un determinado ángulo, de esta manera el medio puede pasar de un lado a otro y viceversa (Kämäräinen-Karppinen et al., 2010). Los frascos de cultivo que usa son rectangulares y autoclavables, con una apertura lateral de boca ancha y cerrados con una tapa rosca con filtro de membrana. Tras la siembra los frascos se ponen en rejillas con estanterías mecánicas de inclinación, de esta forma se crean ondas, y alternativamente se sumergen y airean los explantes (Uchendu et al., 2011).

La principal ventaja de este tipo de sistemas es que se puede colocar un gran número de frascos en una rejilla y no requiere de una línea de aire adicional. Sin embargo, se necesita de una plataforma electromecánica que se incline, la cual aumenta los costos de energía. Además, precisa de un mayor espacio para su operación, carecen de una buena renovación de aire, ventilación forzada y reemplazo

del medio nutritivo (Kämäräinen-Karppinen et al., 2010). En la Figura 7 se puede apreciar el diseño y principio de operación del sistema Rocker.

Figura 7.

Diseño y principio de operación del sistema Rocker

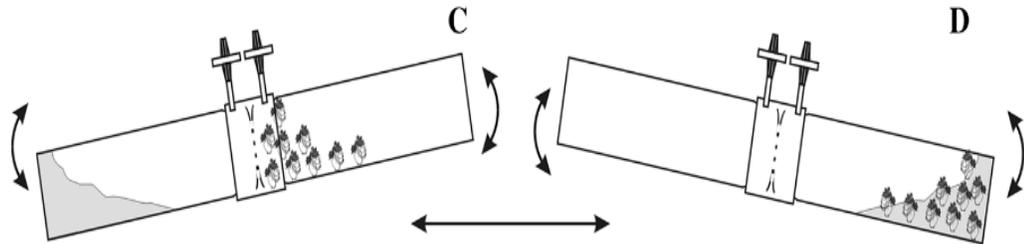


Nota. Tomado de Temporary immersion systems in plant biotechnology por Georgiev et al., 2014.

BioMINT. Biorreactor de medio tamaño, que contiene dos frascos cilíndricos autoclavables unidos por un adaptador perforado, el cual permite el paso del medio de cultivo y mantiene a los explantes en su sitio cuando se cambia de posición (Robert et al., 2006). Uno de los frascos se utiliza para la siembra y el otro para medio de cultivo líquido. Los adaptadores posibilitan la aplicación de ventilación forzada y CO₂. Debido a su facilidad de uso, estos sistemas se implementan en micropropagación (Bello-Bello et al., 2010). A continuación, es posible observar el diseño y principio de operación del sistema BioMINT (Ver Figura 8).

Figura 8.

Diseño y principio de operación del sistema BioMINT

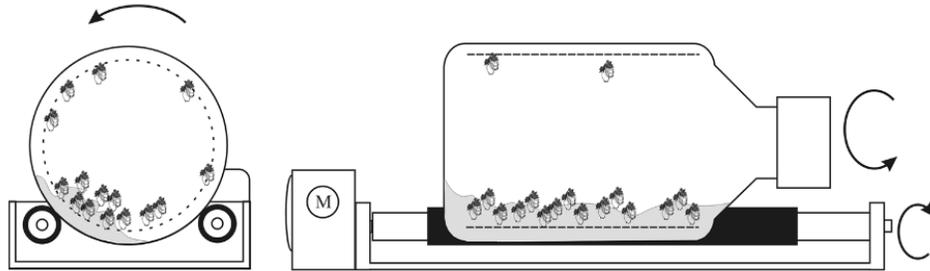


Nota. Tomado de Temporary immersion systems in plant biotechnology. Georgiev et al., 2014.

Sistema de tambor giratorio. Este sistema consiste en un rodillo en el que se coloca una botella de plástico autoclavable, dentro de la cual se pone una malla de acero inoxidable o una espuma de poliuretano para el soporte de los explantes. El rodillo rota a una velocidad lenta permitiendo que los explantes sean periódicamente sumergidos y expuestos (Akita & Ohta, 1998). Este sistema es comúnmente utilizado debido a su simple construcción, sin embargo, presenta la incapacidad de establecer tiempos independientes y prolongados durante los períodos de inmersión y exposición, existe mayor esfuerzo cortante gracias a la mezcla mecánica y falta de opciones para la ventilación (Reis et al., 2011). En la Figura 9 se puede observar el diseño y principio de operación del sistema de tambor giratorio.

Figura 9.

Diseño y principio de operación del sistema de tambor giratorio

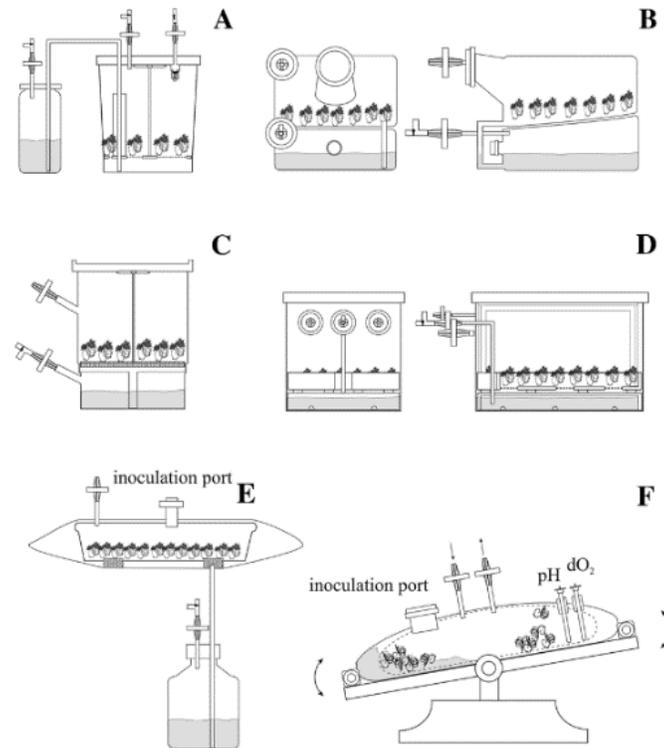


Nota. Tomado de Temporary immersion systems in plant biotechnology por Georgiev et al., 2014.

SIT's desechables y de bajo costo. Con el fin de reducir los costos de inversión para el equipo y reducir espacio, se desarrollaron diferentes tipos de SIT's, con un diseño simple, de bajo costo y con elementos plásticos intercambiables. Estos sistemas son manejables, compactos para almacenamiento, autoclavables y de usos múltiples (Eibl & Eibl, 2008). En la Figura 10, se precisan diferentes tipos de SIT's desechables y de bajo costo.

Figura 10.

Diferentes tipos de SIT's desechables y de bajo costo



Nota. A) El biorreactor RALM funciona según el principio de doble matraz. B) El sistema SETIS funciona de manera similar al sistema SIT de Ebb-and-Flow. C-D) Plantima y Plantform son un SIT's pequeño que funcionan según el principio RITA. E) Box-in-Bag SIT desechable que funciona bajo el principio de Ebb-and-Flow. F) Wave Plataforma oscilantes que utiliza bolsas de cultivo preesterilizadas desechables.

Tomado de Temporary immersion systems in plant biotechnology por Georgiev et al., 2014.

Capítulo III: Materiales y Métodos

Localización del estudio

La optimización de la micropropagación de ambas variedades comerciales de arándano (*Vaccinium corymbosum* Linnaeus) utilizando sistemas de inmersión temporal (SIT's-RITA) se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Cultivo de Tejido del Departamento Nacional de Biotecnología en la Estación Experimental Santa Catalina del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias – INIAP. Las características geográficas se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2.

Ubicación del Sitio Experimental

Característica	Descripción
Provincia	Pichincha
Cantón	Mejía
Parroquia	Cutuglagua
Altitud	3100 msnm
Latitud UTM	0° 22' 8" S
Longitud UTM	78 ° 33' 24" O

Material Vegetal

La fuente de explantes destinados a los diferentes tratamientos fueron plantas *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* Linnaeus, procedentes de la reserva del Laboratorio de Cultivo de Tejidos del INIAP, que se encontraban en fase de multiplicación.

Fase 1: Micropropagación de *Vaccinium corymbosum* Linnaeus en Sistemas de Inmersión Temporal (SIT's)

Preparación del Medio de Cultivo Líquido

Se preparó el medio de cultivo estandarizado por el Departamento Nacional de Biotecnología del INIAP para el género *Vaccinium*. Para lo cual se utilizó sales minerales McCown's Woody Plant (WPM) (Lloyd y McCown, 1981), 30 g.L⁻¹ de sucrosa y 0.5 ppm de zeatina (ZEA). El pH del medio de cultivo se reguló a 5 y se dispensó 200 ml de medio de cultivo en cada frasco RITA® (Chacha, 2020; Meneses et al., 2022). Finalmente, los envases se autoclavaron a 15 PSI y 121°C durante 15 minutos.

Calibración de Tiempo y Frecuencia de los SIT's-RITA

El tiempo y frecuencia de inmersión se estableció en base a previas investigaciones realizadas con el género *Vaccinium* en el Departamento Nacional de Biotecnología-INIAP. Chacha (2020) menciona que la frecuencia de inmersión con resultados óptimos en SIT's-RITA fue de 6 veces al día con un tiempo de inmersión de un minuto. Los tiempos fueron regulados con un programador tipo PLC (Programmable Logic Controller).

Establecimiento del Ensayo

De cada variedad de arándano se escogieron plantas *in vitro* con características morfológicas similares, libres de contaminación y con igual tiempo de siembra (60 días). En cámara de flujo laminar, partiendo de secciones nodales, se obtuvieron el número y tipo de explantes correspondientes a cada tratamiento del estudio. Cada explante tuvo un tamaño inicial de 20 mm.

De acuerdo con cada tratamiento, los explantes se trasladaron a los recipientes RITA® con 200 ml de medio de cultivo líquido autoclavado. Posteriormente, en cada frasco se instalaron mangueras con filtros hidrófobos de 0.2 µm, uno central (entrada de aire) y otro lateral (salida de aire). El filtro central

se conectó al sistema de inyección de aire. Las condiciones del cuarto de crecimiento fueron el fotoperiodo de 16 horas luz, temperatura de 26 ± 2 °C y humedad relativa del 40%.

Análisis Estadístico

La unidad experimental estuvo conformada por un frasco RITA® con 200 ml de medio de cultivo con el número y tipo de explantes correspondiente para cada tratamiento en estudio. El biorreactor RITA® tiene un tamaño proporcional con 150 mm de altura y 130 mm de diámetro.

Factores de Estudio. Se tuvieron tres factores de estudio.

Variedad de arándano. Se utilizó dos variedades comerciales de arándano (*Vaccinium corymbosum* Linnaeus), que por asuntos de confidencialidad por parte del Departamento Nacional de Biotecnología INIAP, se las denominará como V_1 y V_2 a lo largo de todo el documento.

Densidad de Siembra. Se precisaron tres densidades de siembra diferentes para cada variedad: (D_1) 5, (D_2) 15 y (D_3) 25 explantes.

Tipo de Explante. Se determinaron dos tipos de explantes con yemas apicales (E_1) y yemas laterales (E_2) para cada variedad de arándano.

Tratamientos. La interacción entre los factores de estudio mencionados anteriormente dio como resultado doce tratamientos para la micropropagación de *Vaccinium corymbosum* Linnaeus con el uso de SIT's-RITA (Tabla 3).

Tabla 3.

Tratamientos del ensayo de micropropagación in vitro Vaccinium corymbosum Linnaeus con SIT's-RITA

Tratamiento	Código	Descripción
T _{1.1}	V ₁ D ₁ E ₁	Variedad 1 + 5 explantes + yema apical
T _{1.2}	V ₁ D ₁ E ₂	Variedad 1 + 5 explantes + yema lateral
T _{1.3}	V ₁ D ₂ E ₁	Variedad 1 + 15 explantes + yema apical
T _{1.4}	V ₁ D ₂ E ₂	Variedad 1 + 15 explantes + yema lateral
T _{1.5}	V ₁ D ₃ E ₁	Variedad 1 + 25 explantes + yema apical
T _{1.6}	V ₁ D ₃ E ₂	Variedad 1 + 25 explantes + yema lateral
T _{2.1}	V ₂ D ₁ E ₁	Variedad 2 + 5 explantes + yema apical
T _{2.2}	V ₂ D ₁ E ₂	Variedad 2 + 5 explantes + yema lateral
T _{2.3}	V ₂ D ₂ E ₁	Variedad 2 + 15 explantes + yema apical
T _{2.4}	V ₂ D ₂ E ₂	Variedad 2 + 15 explantes + yema lateral
T _{2.5}	V ₂ D ₃ E ₁	Variedad 2 + 25 explantes + yema apical
T _{2.6}	V ₂ D ₃ E ₂	Variedad 2 + 25 explantes + yema lateral

Diseño Experimental. En el presente proyecto se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo factorial 2x3x2. Se realizaron cuatro repeticiones por cada tratamiento, con el número y tipo de explante según corresponda.

Las variables se evaluaron a los 40 días tras la siembra. Se planteó cinco variables de respuesta en cada tratamiento.

Coficiente de Multiplicación. Se dividió el número de brotes viables de arándanos para el número de explantes introducidos inicialmente. Las observaciones se expresaron en brotes/explante.

Longitud de Brotes. La longitud de brotes de cada especie de arándanos se midió desde la base hasta el meristemo apical con el uso de hojas milimétricas estériles. Se expresó las mediciones en (mm).

Porcentaje de Brotes Viables. Se realizó la relación porcentual entre el número de brotes vivos (sin oxidación e hiperhidratación) y el número total de explantes.

Porcentaje de Oxidación. Se realizó la relación porcentual entre el número total de explantes con síntomas de oxidación, pardeamiento y/o necrosis, el número total de explantes.

Porcentaje de Hiperhidratación. Se relacionó el número de explantes con síntomas de hiperhidratación, vitrificación y fragilidad con el número total de explantes.

El análisis de varianza (ANOVA) se llevó a cabo con un nivel de significancia del 5%. Para la diferencia de las medias, se aplicó la prueba de significancia de Duncan al 5%. Se comprobó también la normalidad de las variables con Kolmogorov – Smirnov. Los análisis estadísticos se realizaron en el software RStudio (RStudio Team, 2021).

Para las variables que no presentaron normalidad, se optó por la transformación más adecuada como arcoseno (%). Una vez ajustados los datos de las variables se aplicó el análisis de varianza (ANOVA).

El esquema del ANOVA para optimizar la producción de plantas *in vitro* de arándanos sometidos a Sistemas de Inmersión Temporal se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4.

ANOVA para el ensayo de micropropagación de *Vaccinium corymbosum* Linnaeus con el uso de SIT's-RITA.

Fuente de Variación	Grados de Libertad
Total	47
Tratamientos	11
Variedades (V)	1
Densidad de Siembra (D)	2
Tipo de Explante (E)	1
V x D	2
V x E	1
D x E	2
V x D x E	2
Error Experimental	36

Fase 2: Micropropagación de *Vaccinium corymbosum* Linnaeus en Sistema Convencional

En esta etapa se micropropagó secciones nodales de *Vaccinium corymbosum* Linnaeus en medio semisólido. Con el propósito de establecer un control que permita la comparación de variables con el sistema de inmersión temporal. Para lo cual el mejor tratamiento de cada variedad de arándano en SIT's-RITA de la etapa anterior fueron contrastados con el sistema convencional.

Preparación del Medio de Cultivo Semisólido

Se utilizó el medio de cultivo estandarizado por el Departamento Nacional de Biotecnología del INIAP para el género *Vaccinium*. Para lo cual se utilizó sales minerales McCown's Woody Plant (WPM), 30 g.L⁻¹ de sucrosa, 0.5 ppm de zeatina (ZEA) y 6 g.L⁻¹ de agar (Meneses et al., 2022). El pH del medio de cultivo se reguló a 5 y se dispensó 30 ml de medio de cultivo en cada frasco de vidrio. Los envases fueron autoclavados a 15 PSI y 121°C durante 15 minutos.

Fase de Multiplicación

Esta etapa se trabajó bajo el protocolo estandarizado para la producción de *in vitro* plantas del género *Vaccinium* del INIAP (Informe Anual DNB, 2020; Informe Anual DNB, 2021). Para cada variedad de arándano, se seleccionaron plantas *in vitro* con similares características morfológicas, libres de contaminación y con el mismo tiempo de siembra (60 días) en fase de multiplicación del Laboratorio del Departamento Nacional de Biotecnología del INIAP.

En la cámara de flujo laminar, se cotaron secciones nodales de 10 mm de longitud con yemas laterales. Se sembró 10 explantes por frasco y se incubó durante 60 días. El cuarto de cultivo tuvo un fotoperiodo de 16 horas luz, temperatura de 24 ± 2 °C y humedad relativa del 40%.

Análisis Estadístico

Para el sistema convencional en medio de cultivo semisólido, la unidad experimental estuvo conformada por un frasco de vidrio con 30 ml medio de cultivo con 10 explantes. Las dimensiones del frasco fueron de 18 cm de altura y 10.2 cm de diámetro. En sistemas de inmersión temporal la unidad experimental estuvo conformada por un frasco RITA® con 200 ml de medio de cultivo con los tratamientos correspondientes en estudio. El biorreactor RITA® tiene un tamaño proporcional de 150 mm de altura y 130 mm de diámetro.

Factores de Estudio. Se evaluaron dos factores de estudio.

Tipo de Sistema de Micropropagación. Se utilizó dos sistemas de micropropagación *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* Linnaeus en SIT's-RITA (S₁) y sistema convencional (S₂).

Variedad de arándano. Se utilizó dos variedades comerciales de arándano (*Vaccinium corymbosum* Linnaeus), que por asuntos de confidencialidad por parte del Departamento Nacional de Biotecnología INIAP, se las denominará como V₁ y V₂.

Tratamientos. La interacción entre los factores de estudio mencionados anteriormente se originó cuatro tratamientos en la micropropagación de *Vaccinium corymbosum* Linnaeus (Tabla 5).

Tabla 5.

Tratamientos del ensayo de micropropagación in vitro de arándano (Vaccinium corymbosum Linnaeus)

Tratamiento	Código	Descripción
T _{s.1}	S ₁ V ₁	SIT's + Variedad 1
T _{s.2}	S ₁ V ₂	SIT's + Variedad 2
T _{s.3}	S ₂ V ₁	Sistema Convencional + Variedad 1
T _{s.4}	S ₂ V ₂	Sistema Convencional + Variedad 2

Diseño Experimental. El resultado de los mejores tratamientos de la multiplicación en sistemas RITA se implementaron con los datos de multiplicación de sistema convencional en un Diseño Completamente al Azar (DCA), con arreglo factorial 2x2. Se consideró cuatro repeticiones por tratamiento. El análisis estadístico se realizó con el software R Studio (RStudio Team, 2021).

El análisis estadístico de los resultados se realizó para las siguientes variables:

Coefficiente de Multiplicación. Se dividió el número de brotes viables de arándanos obtenidos para el número de explantes introducidos inicialmente. Las observaciones se expresaron en brotes/explante.

Longitud de Brotes. Se midió desde la base del brote hasta el meristemo apical con el uso de hojas milimétricas autoclavadas. Se expresó las mediciones en milímetros (mm).

Porcentaje de Brotes Viables. Se realizó la relación porcentual entre el número de brotes vivos (sin oxidación y/o hiperhidratación) y el número total de explantes.

Porcentaje de Oxidación. Se realizó la relación porcentual entre el número total de explantes con síntomas de oxidación, pardeamiento y/o necrosis, y el número total de explantes.

Porcentaje de Hiperhidratación. El número de explantes con síntomas de hiperhidratación, vitrificación y fragilidad se relacionó con el número total de explantes.

A los datos se aplicó la prueba de normalidad Kolmogorov – Smirnov. Se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 5%. Además, se aplicó la prueba de Duncan al 5% para el conjunto de datos.

El esquema del análisis de varianza entre los SIT's-RITA y método convencional en la micropropagación de plantas de arándano se detalla en la Tabla 6.

Tabla 6.

*ANOVA para el ensayo de micropropagación de *Vaccinium corymbosum* Linnaeus.*

Fuente de Variación	Grados de Libertad
Total	15
Tratamientos	3
Variedad (V)	1
Sistema de Propagación (S)	1
V x S	1
Error Experimental	12

Capítulo IV: Resultados

Fase 1: Micropropagación de *Vaccinium corymbosum* Linnaeus en Sistemas de Inmersión Temporal (SIT's)

En esta primera etapa se evaluaron las cinco variables de respuesta (coeficiente de multiplicación, longitud de brote, porcentaje de brotes viables, porcentaje de oxidación y porcentaje de hiperhidratación) de las dos variedades de arándano cultivadas en los sistemas de inmersión temporal a los 40 días tras la siembra.

Coefficiente de Multiplicación

La prueba de normalidad Kolmogorov – Smirnov mostró que los datos siguen una distribución normal. En la micropropagación de arándano en SIT's-RITA, el coeficiente de multiplicación mostró diferencias significativas para los niveles de los factores densidad de siembra y variedad de arándano, los niveles del factor tipo de explante no fueron significativos. Todas las interacciones de los factores estudiados no evidenciaron diferencias significativas (Tabla 7 del ANOVA).

Tabla 7.

ANOVA para el coeficiente de multiplicación en la micropropagación de *Vaccinium corymbosum* Linnaeus con SIT's-RITA.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Error cuadrático medio	Valor F	Pr (>F)
Total	47			
Tratamientos	11			
Densidad de Siembra (D)	2	32.84	15.71	1.24E-05*
Tipo de Explante (E)	1	1.97	0.942	0.3383 ^{ns}
Variedad de Arándano (V)	1	157.78	75.48	2.31E-10*
DxE	2	4.01	1.919	0.1614 ^{ns}
DxV	2	6.39	3.058	0.06 ^{ns}
ExV	1	3.01	1.438	0.2382 ^{ns}
DxExV	2	4.67	2.235	0.1217 ^{ns}
Error	36			
Coeficiente de Variación		34.91		

Nota. (ns): No significativo, (*) Significativo.

La prueba de significancia y comparación de medias para el coeficiente de multiplicación en la micropropagación de arándano se muestra en la Tabla 8. Para esta variable, se encontró que el factor de estudio densidad de siembra muestra diferencias significativas en sus niveles, encontrándose cada nivel en un solo rango. La densidad D₂ (15 explantes) presentó mayor coeficiente de multiplicación con 5.64 brotes/explante en el rango a. Mientras que, la densidad D₁ (5 explantes) evidenció la menor tasa de proliferación de brotes con 2.79 brotes/explante en el rango c. Para el factor de estudio tipo de explante, no se mostró diferencias significativas, el mejor valor matemático de estos niveles le corresponde al E₂ (yema lateral) con 4.34 brotes/explante.

Para el factor, variedad de arándano, se mostró que existen diferencias significativas. La variedad 1 (V_1) evidenció alto coeficiente de multiplicación con 5.95 brotes/explante y se ubica en el rango a como mejor tratamiento. Mientras que, para la variedad 2 (V_2) esta variable disminuyó, obteniéndose un valor de 2.33 brotes/explante y se ubica en el rango b.

Tabla 8.

*Prueba de Significancia y Comparación de Medias para el coeficiente de multiplicación en la micropropagación de *Vaccinium corymbosum* Linnaeus con SIT's-RITA.*

Factores	Descripción	Coefficiente de Multiplicación (brote/explante)
Densidad (D)	D ₁ = 5 explantes	2.79 c
	D ₂ = 15 explantes	5.64 a
	D ₃ = 25 explantes	3.99 b
Tipo de Explante (E)	E ₁ = yema apical	3.94
	E ₂ = yema lateral	4.34
Variedad (V)	V ₁ = Variedad 1	5.95 a
	V ₂ = Variedad 2	2.33 b

Nota. Los datos con letras diferentes expresan estadísticas diferencias significativas.

La interacción entre los factores densidad de siembra y tipo de explante no evidencia significación estadística, sin embargo, los tratamientos con los niveles 15 explantes (D_2) y yemas apicales (E_1) evidenciaron altos valores matemáticos de coeficiente de multiplicación con 5.52 brotes/explante. Los tratamientos con los niveles 5 explantes (D_1) y yemas apicales (E_1) mostraron el coeficiente de multiplicación más bajo con 2.05 brotes/explantes (Tabla 9).

En la interacción de los factores variedad de arándano por densidad de siembra se evidenció que los tratamientos con V_1 y D_2 (15 explantes) alcanzaron el mayor coeficiente de multiplicación con 8.18 brotes/explante. Los tratamientos con V_2 y D_1 presentan el menor coeficiente de multiplicación con 1.38 brotes/explante (Tabla 9).

La variedad de arándano en interacción con el tipo de explante evidenció a los niveles V_1 y E_1 (yemas apicales) un coeficiente de multiplicación de 6.00 brotes/explante. Contrario a esto, V_2 por E_1 (yema apical) presentó el menor coeficiente de multiplicación con 1.88 brotes/explante (Tabla 9).

Tabla 9.

*Prueba de Significancia y Comparación de Medias, interacción de factores, para el coeficiente de multiplicación en la micropropagación de *Vaccinium corymbosum* Linnaeus con SIT's-RITA.*

Factores	Descripción	Coefficiente de Multiplicación (brote/explante)
DxE	5 explantes + yema apical	2.05
	5 explantes + yema lateral	3.53
	15 explantes + yema apical	5.52
	15 explantes + yema lateral	5.77
	25 explantes + yema apical	4.25
	25 explantes + yema lateral	3.74
VxD	Variedad 1 + 5 explantes	4.20
	Variedad 1 + 15 explantes	8.18
	Variedad 1 + 25 explantes	5.48
	Variedad 2 + 5 explantes	1.375
	Variedad 2 + 15 explantes	3.10
	Variedad 2 + 25 explantes	2.51
VxE	Variedad 1 + Yema apical	6.00
	Variedad 1 + Yema lateral	5.91
	Variedad 2 + Yema apical	1.88
	Variedad 2 + Yema lateral	2.78

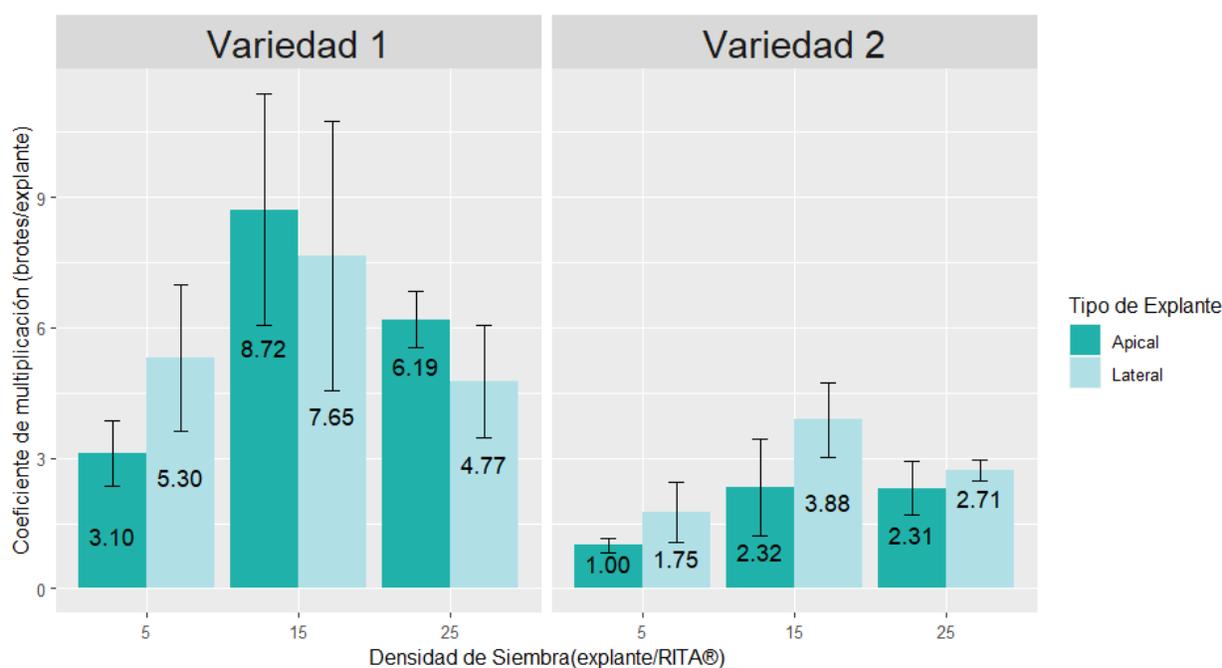
Nota. Densidad de Siembra (D), Tipo de Explante (E), Variedad de arándano (V).

En la Figura 11 se observa la influencia de la interacción de los tres factores de estudio en la micropropagación de dos variedades de arándano con SIT's-RITA. El tratamiento $T_{1.3}$ (Variedad 1, 15 explantes, yemas apicales) evidenció mayor coeficiente de multiplicación con 8.72 brotes/explantes. Mientras que, el tratamiento $T_{2.1}$ (Variedad 2, 5 explantes, yemas apicales) tuvo un coeficiente de

multiplicación menor con 1.00 brote/explante. La mayor tasa que evidenció para la V₂ fue con el tratamiento T_{2.4} (15 explantes, yemas laterales) con 3.88 brotes/explante.

Figura 11.

*Efecto de la densidad de siembra, tipo de explante y variedad de *Vaccinium corymbosum* Linnaeus sobre el coeficiente de multiplicación con SIT's-RITA.*

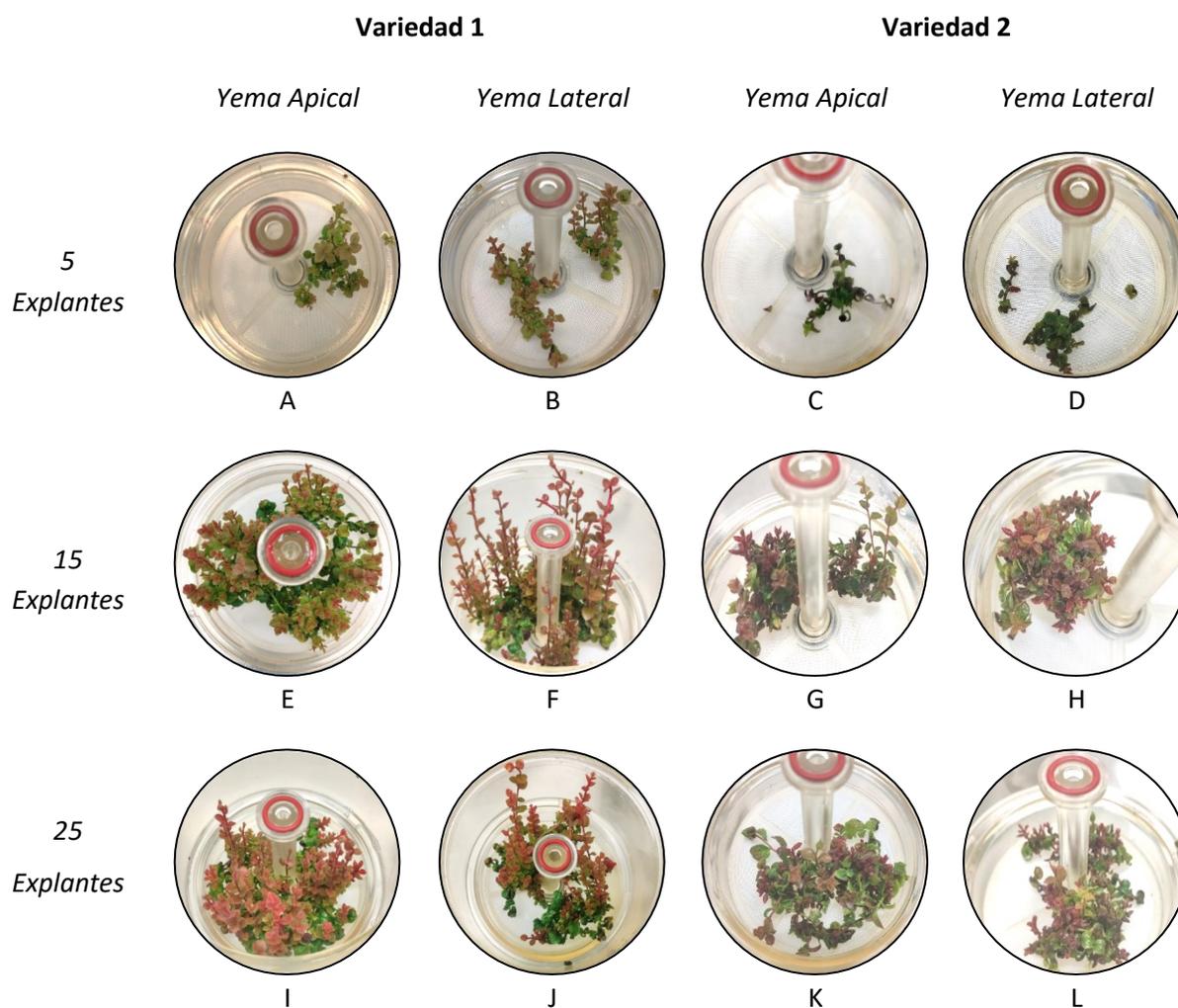


Nota. En la figura se puede observar la influencia de los tres factores de estudio en el coeficiente de multiplicación en la micropropagación con SIT's-RITA. Los tratamientos para la V₁ son: T_{1.1} (5 explantes, yemas apicales), T_{1.2} (5 explantes, yemas laterales), T_{1.3} (15 explantes, yemas apicales), T_{1.4} (15 explantes, yemas laterales), T_{1.5} (25 explantes, yemas apicales), T_{1.6} (5 explantes, yemas apicales). Los tratamientos para la V₂ son: T_{2.1} (5 explantes, yemas apicales), T_{2.2} (5 explantes, yemas laterales), T_{2.3} (15 explantes, yemas apicales), T_{2.4} (15 explantes, yemas laterales), T_{2.5} (25 explantes, yemas apicales), T_{2.6} (5 explantes, yemas apicales).

En la Figura 12, se observa el crecimiento de brotes en 40 días de cultivo en SIT's-RITA. Se puede evidenciar que los tratamientos de V₁ presentan un desarrollo más vigoroso que V₂.

Figura 12.

Influencia de los Sistemas de Inmersión Temporal en el coeficiente de multiplicación de Vaccinium corymbosum Linnaeus.



Nota. En la figura se evidencia el coeficiente de multiplicación de *Vaccinium corymbosum* Linnaeus tras 40 días de cultivo en SIT's-RITA correspondiente a cada tratamiento.

Longitud de Brote

La prueba de normalidad Kolmogorov – Smirnov mostró que los datos de esta variable son normales. En la micropropagación de arándano en SIT's-RITA, la longitud de brote mostró diferencias significativas para los niveles del factor variedad de arándano. Los niveles de los factores densidad de siembra y tipo de explante no fueron significativos. Además, todas las interacciones de los factores estudiados no evidenciaron diferencias significativas (Tabla 10 del ANOVA).

Tabla 10.

ANOVA para la longitud de brotes en la micropropagación de Vaccinium corymbosum Linnaeus con SIT's-RITA.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Error cuadrático medio	Valor F	Pr (>F)
Total	47			
Tratamientos	11			
Densidad de Siembra (D)	2	64.60	2.25	0.12 ^{ns}
Tipo de Explante (E)	1	23.00	0.80	0.37 ^{ns}
Variedad de Arándano (V)	1	1302.30	45.26	7.50E-08*
DxE	2	36.10	1.25	0.29 ^{ns}
DxV	2	0.60	0.02	0.98 ^{ns}
ExV	1	49.60	1.73	0.19 ^{ns}
DxExV	2	1.30	0.05	0.96 ^{ns}
Promedio	36			
Coefficiente de Variación		38.89		

Nota. (ns): No significativo, (*) Significativo.

La prueba de significancia y comparación de medias para la longitud de brotes en la micropropagación de arándano se muestra en la Tabla 11. Para esta variable, se encontró que V₁ alcanzó mayor longitud de brotes con 19.00 mm de largo en el rango a. Mientras que, la variedad V₂ presentó la menor longitud de brotes con 8.59 mm de largo en el rango b.

Tabla 11.

Prueba de Significancia y Comparación de Medias para la longitud de brotes en la micropropagación de arándano en SIT's-RITA.

Factores	Descripción	Longitud de Brote (mm)
Densidad (D)	D ₁ = 5 explantes	11.79
	D ₂ = 15 explantes	15.81
	D ₃ = 25 explantes	13.79
Tipo de Explante (E)	E ₁ = yema apical	13.10
	E ₂ = yema lateral	14.49
Variedad (V)	V ₁ = Variedad 1	19.00 a
	V ₂ = Variedad 2	8.59 b

Nota. Los datos con letras diferencias expresan estadísticamente diferencias significativas.

En la interacción de los factores, la densidad D₂ (15 explantes) y tipo de explante E₁ (yemas apicales) mostró la mayor longitud de brote con 16.34 mm de largo en el rango a. Mientras que, la densidad D₁ (5 explantes) y tipo de explante E₁ (yemas apicales) evidenció la menor longitud de brote con 9.52 mm de largo en el rango b (Tabla 12).

La interacción entre los factores variedad de arándano y densidad de siembra no evidencia significación estadística, sin embargo, los tratamientos con los niveles V₁ y 15 explantes (D₂) mostraron altos valores matemáticos de longitud de brote con 20.81 mm. Los tratamientos con los niveles V₂ y 5 explantes (D₁) evidenciaron la menor longitud de brote con 6.41 mm (Tabla 12).

La interacción de los factores variedad de arándano y tipo de explante no evidencia significación estadística, sin embargo, los tratamientos con los niveles V₁ y yema lateral (E₂) alcanzaron altos valores matemáticos de longitud de brote con 20.71 mm. Los tratamientos con los niveles V₂ y, yema tanto apical como lateral, mostraron la menor longitud de brote con valores por debajo de 9 mm de largo (Tabla 12).

Tabla 12.

Prueba de Significancia y Comparación de Medias, interacción de factores, para la longitud de brote en la micropropagación de Vaccinium corymbosum Linnaeus con SIT's-RITA.

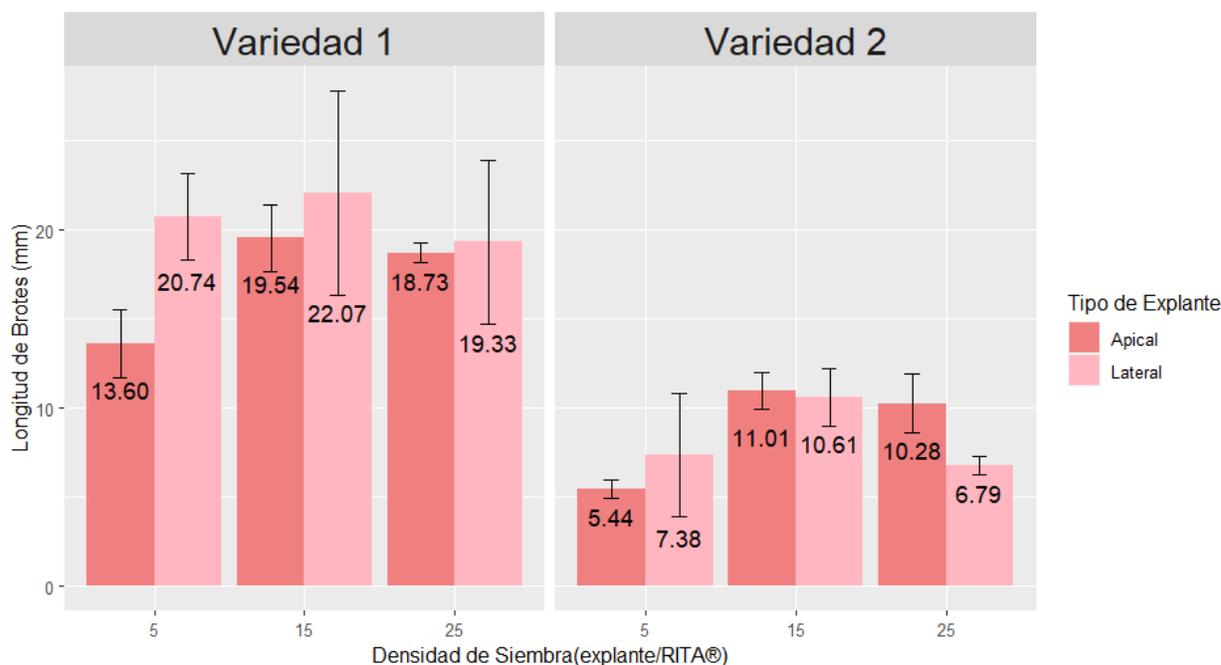
Factores	Descripción	Longitud de Brote (mm)
DxE	5 explantes + yema apical	9.52
	5 explantes + yema lateral	14.06
	15 explantes + yema apical	15.28
	15 explantes + yema lateral	16.34
	25 explantes + yema apical	14.51
	25 explantes + yema lateral	13.06
VxD	Variedad 1 + 5 explantes	17.17
	Variedad 1 + 15 explantes	20.81
	Variedad 1 + 25 explantes	19.03
	Variedad 2 + 5 explantes	6.41
	Variedad 2 + 15 explantes	10.81
	Variedad 2 + 25 explantes	8.54
VxE	Variedad 1 + Yema apical	17.29
	Variedad 1 + Yema lateral	20.71
	Variedad 2 + Yema apical	8.91
	Variedad 2 + Yema lateral	8.26

Nota. Densidad de Siembra (D), Tipo de Explante (E), Variedad de arándano (V).

El efecto de la interacción de los tres factores de estudio en la micropropagación de arándano con SIT's-RITA se observa en la Figura 13. El tratamiento T_{1.4} (Variedad 1, 15 explantes, yemas apicales) desarrollo mayor longitud de brote con 22.07 mm. El tratamiento T_{2.6} (Variedad 2, 25 explantes, yemas laterales) mostró menor longitud de brote con 6.79 mm.

Figura 13.

Efecto de la densidad de siembra, tipo de explante y variedad de Vaccinium corymbosum Linnaeus en longitud de brote con SIT's-RITA.

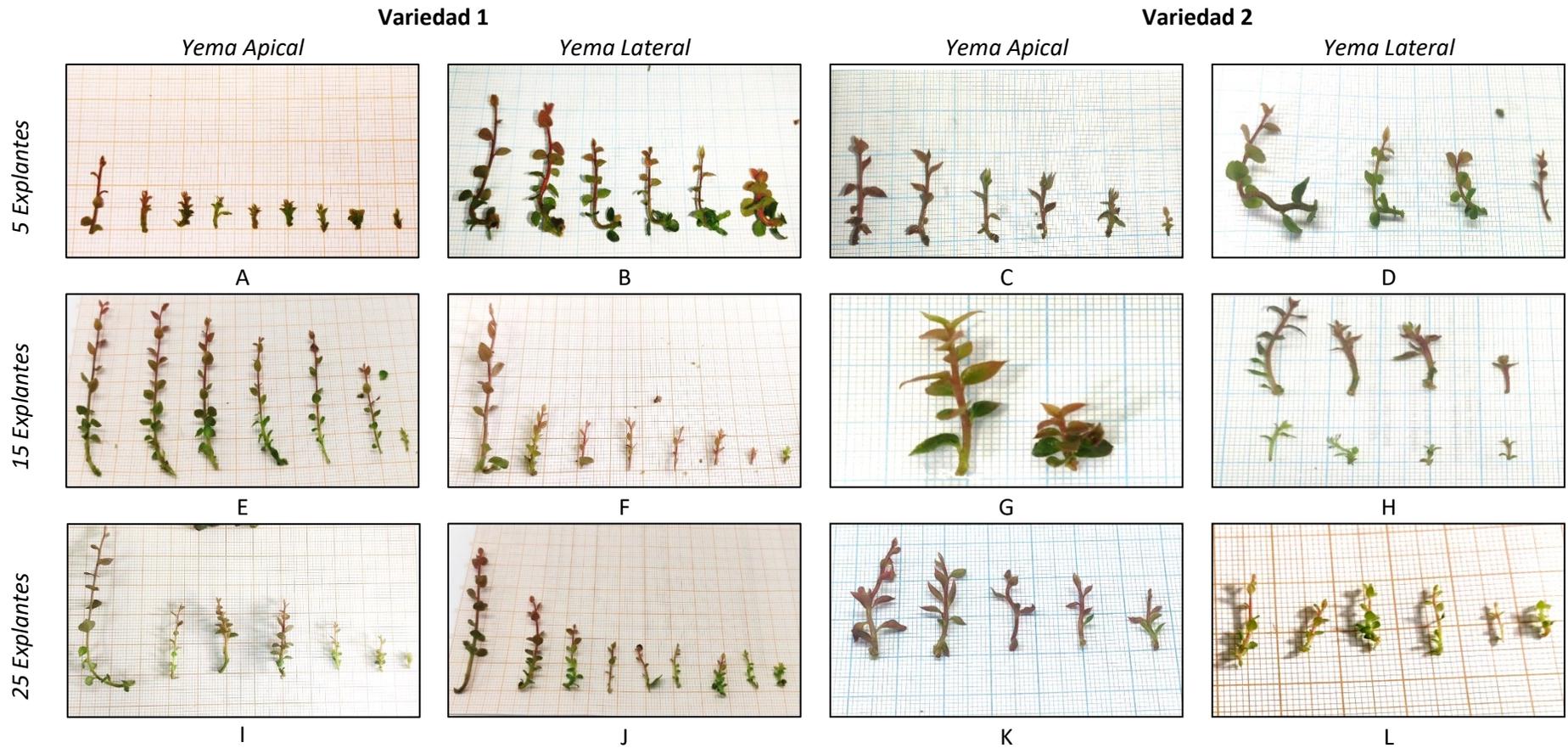


Nota. En la figura se puede observar la influencia de los tres factores de estudio en la longitud de brotes micropropagados con SIT's-RITA. Los tratamientos para la V₁: T_{1.1} (5 explantes, yemas apicales), T_{1.2} (5 explantes, yemas laterales), T_{1.3} (15 explantes, yemas apicales), T_{1.4} (15 explantes, yemas laterales), T_{1.5} (25 explantes, yemas apicales), T_{1.6} (5 explantes, yemas apicales). Los tratamientos para la V₂: T_{2.1} (5 explantes, yemas apicales), T_{2.2} (5 explantes, yemas laterales), T_{2.3} (15 explantes, yemas apicales), T_{2.4} (15 explantes, yemas laterales), T_{2.5} (25 explantes, yemas apicales), T_{2.6} (5 explantes, yemas apicales).

En la Figura 14, se muestra la influencia del cultivo en SIT's-RITA de *Vaccinium corymbosum* Linnaeus en la longitud de brotes. Se puede evidenciar que la longitud de brote es homogénea entre los tratamientos, por lo que no hubo diferencias significativas.

Figura 14.

Influencia de los Sistemas de Inmersión Temporal en la longitud de brotes en dos variedades de *Vaccinium corymbosum* Linnaeus.



Nota. En la figura se evidencia el efecto del cultivo en SIT's-RITA de *Vaccinium corymbosum* Linnaeus en la longitud de brotes de obtenidos a los 40 días.

Porcentaje de Brotes Viables

Los datos de esta variable se ajustaron a la normalidad aplicando la transformación de datos arcoseno (%). En la micropropagación de arándano en SIT's-RITA, el porcentaje de brotes viables mostró diferencias significativas para los niveles del factor variedad de arándano y, la interacción de los factores densidad de siembra y variedad de arándano (Tabla 13 del ANOVA).

Tabla 13.

ANOVA para el porcentaje de brotes viables en la micropropagación de Vaccinium corymbosum Linnaeus con SIT's-RITA.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Error cuadrático medio	Valor F	Pr (>F)
Total	47			
Tratamientos	11			
Densidad de Siembra (D)	2	22.30	0.26	0.78 ^{ns}
Tipo de Explante (E)	1	274.00	3.14	0.09 ^{ns}
Variedad de Arándano (V)	1	1797.20	20.59	6.12E-05*
DxE	2	239.90	2.75	0.07 ^{ns}
DxV	2	508.60	5.83	6.43E-03*
ExV	1	80.30	0.92	0.34 ^{ns}
DxExV	2	38.60	0.44	0.65 ^{ns}
Promedio	36			
Coeficiente de Multiplicación			11.75	

Nota. (ns): No significativo, (*) Significativo.

La prueba de significancia y comparación de medias para el porcentaje de brotes viables en la micropropagación de arándano con SIT's-RITA se muestra en la Tabla 14. El factor de estudio variedad mostró diferencias significativas en sus niveles, encontrándose cada nivel en un solo rango. V₁ presentó el mayor porcentaje de brotes viables con 85.64% en el rango a, mientras que, V₂ evidenció el menor porcentaje de brotes viables con 73.40% en el rango b. Los factores densidad de siembra y tipo de explante no mostraron diferencias significativas en sus niveles.

Tabla 14.

Prueba de Significancia y Comparación de Medias para la proliferación de brotes viables en la micropropagación de arándano con SIT's-RITA.

Factores	Descripción	Brotes viables (%)	Brotes viables ⁽¹⁾ (%)
Densidad (D)	D ₁ = 5 explantes	94.79	78.68
	D ₂ = 15 explantes	97.54	80.87
	D ₃ = 25 explantes	96.25	79.02
Tipo de Explante (E)	E ₁ = yema apical	96.99	81.90
	E ₂ = yema lateral	95.40	77.10
Variedad (V)	V ₁ = Variedad 1	98.48	85.64 a
	V ₂ = Variedad 2	93.90	73.40 b

Nota. Los datos con letras diferencias expresan estadísticamente diferencias significativas. (1) Datos transformados con arcoseno (%).

La interacción densidad de siembra y tipo de explante no evidenció diferencias significativas. La D₂ y E₁ (15 explantes, yemas apicales) mostró el mayor porcentaje de brotes viables con 87.13%. Mientras que D₂ y E₂ (15 explantes, yemas laterales) presentó el menor porcentaje de brotes viables con 74.61% (Tabla 15).

La interacción variedad y densidad de siembra no mostró diferencias significativas. Los tratamientos V₁ con D₁ (5 explantes) y D₃ (25 explantes) presentaron los mayores valores matemáticos de porcentaje de brotes viables con 90.00% y 85.92%, respectivamente y se encuentra en el primer rango. Por otro lado, los tratamientos V₂ con D₁ (5 explantes) mostró el menor valor matemático de porcentaje de brotes viables con 67.35% y se encuentra en el último rango (Tabla 15).

La interacción variedad y tipo de explante no evidencia significancia estadística, sin embargo, los tratamientos V₁ y E₁ (yemas apicales) presentaron el mayor valor matemático de porcentaje de brotes

viabiles con 89.32%. Mientras que, los tratamientos V₂ y E₂ (yemas laterales) mostraron el menor valor matemático de porcentaje de brotes viables con 72.31% (Tabla 15).

Tabla 15.

*Prueba de Significancia y Comparación de Medias, interacción de factores, la proliferación de brotes viables en la micropropagación de *Vaccinium corymbosum* Linnaeus con SIT's-RITA.*

Factores	Descripción	Brotos viables (%)	Brotos viables ⁽¹⁾ (%)
DxE	5 explantes + yema apical	93.47	77.19
	5 explantes + yema lateral	96.11	80.16
	15 explantes + yema apical	99.57	87.13
	15 explantes + yema lateral	95.51	74.61
	25 explantes + yema apical	97.94	81.41
	25 explantes + yema lateral	94.57	76.62
VxD	Variedad 1 + 5 explantes	100.0	90.00
	Variedad 1 + 15 explantes	96.71	81.00
	Variedad 1 + 25 explantes	98.74	85.92
	Variedad 2 + 5 explantes	89.58	67.35
	Variedad 2 + 15 explantes	98.36	80.74
	Variedad 2 + 25 explantes	93.77	72.11
VxE	Variedad 1 +Yema apical	99.94	89.32
	Variedad 1 +Yema lateral	97.02	81.96
	Variedad 2 + Yema apical	94.04	74.50
	Variedad 2 + Yema lateral	93.77	72.31

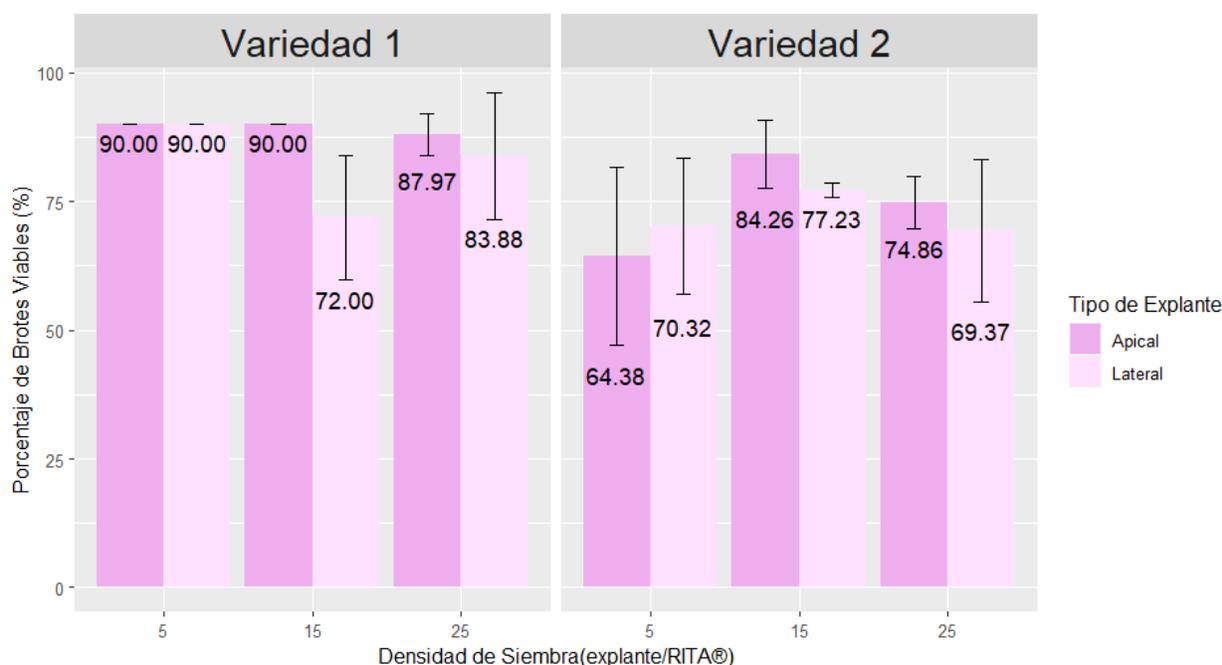
Nota. Los datos con letras diferencias expresan estadísticamente diferencias significativas. (1) Datos transformados con la función arcoseno. Densidad de Siembra (D), Tipo de Explante (E), Variedad de arándano (V).

En la Figura 15, se muestra la influencia de los SIT's-RITA en la micropropagación de *Vaccinium corymbosum* Linnaeus tras 40 días de cultivo. La interacción de los factores variedad, densidad de siembra y tipo de explante mostró que los tratamientos T_{1.1}, T_{1.2}, T_{1.3} presentaron altos porcentajes de

brotos viables con 90%, respectivamente. Mientras que, el menor porcentaje de brotes viables se obtuvo con el tratamiento T_{2.1} con 64.38%.

Figura 15.

Efecto de la densidad de siembra, tipo de explante y variedad de Vaccinium corymbosum Linnaeus en el porcentaje de brotes viables con SIT's-RITA

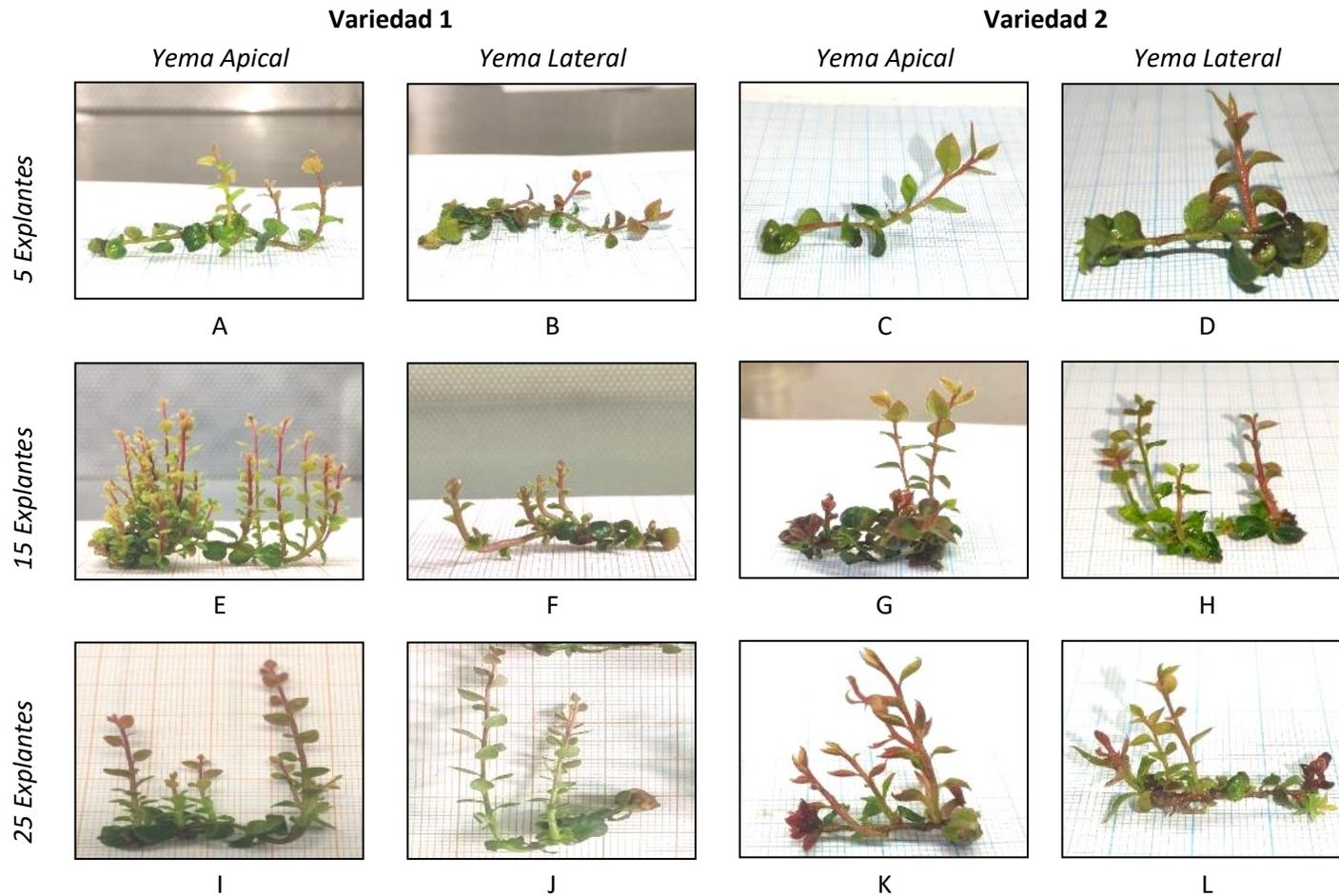


Nota. En la figura se puede observar el efecto de los tres factores de estudio en el porcentaje de brotes viables desarrollados en SIT's. Los tratamientos para la V₁: T_{1.1} (5 explantes, yemas apicales), T_{1.2} (5 explantes, yemas laterales), T_{1.3} (15 explantes, yemas apicales), T_{1.4} (15 explantes, yemas laterales), T_{1.5} (25 explantes, yemas apicales), T_{1.6} (5 explantes, yemas apicales). Los tratamientos para la V₂: T_{2.1} (5 explantes, yemas apicales), T_{2.2} (5 explantes, yemas laterales), T_{2.3} (15 explantes, yemas apicales), T_{2.4} (15 explantes, yemas laterales), T_{2.5} (25 explantes, yemas apicales), T_{2.6} (5 explantes, yemas apicales).

En la Figura 16, se muestran los explantes cultivados por 40 días en SIT's-RITA, correspondientes a cada tratamiento.

Figura 16.

Influencia de los Sistemas de Inmersión Temporal en el porcentaje de brotes de *Vaccinium corymbosum* Linnaeus



Nota. En la figura se evidencia el efecto de los SIT's en la micropropagación de *Vaccinium corymbosum* Linnaeus con el porcentaje de brotes viables obtenidos a los 40 días de cultivo.

Porcentaje de Oxidación

Para esta variable los datos se ajustaron a la normalidad con la transformación arcoseno (%). En la micropropagación de arándano en SIT's-RITA, el porcentaje de oxidación mostró diferencias significativas para los niveles de los factores densidad de siembra, tipo de explante y variedad de arándano. Las interacciones densidad de siembra y tipo de explante, y, densidad de siembra y variedad de arándano también presentaron diferencias significativas (Tabla 16 del ANOVA).

Tabla 16.

ANOVA para el porcentaje de oxidación en la micropropagación de Vaccinium corymbosum Linnaeus con SIT's-RITA.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Error cuadrático medio	Valor F	Pr (>F)
Total	47			
Tratamientos	11			
Densidad de Siembra (D)	2	2.69	4.59	0.02*
Tipo de Explante (E)	1	4.58	7.81	8.28E-03*
Variedad de Arándano (V)	1	3.38	5.77	2.16E-02*
DxE	2	2.38	4.06	0.03*
DxV	2	4.06	6.93	2.85E-03*
ExV	1	0.00	0.00	0.98 ^{ns}
DxExV	2	1.39	2.36	0.11 ^{ns}
Error	36			
Coeficiente de Variación		133.92		

Nota. (ns): No significativo, (*) Significativo.

La prueba de significancia y comparación de medias para el porcentaje de oxidación en la micropropagación de arándano se muestra en la Tabla 17. Para esta variable, se encontró que la densidad D₁ (5 explantes) presentó el menor porcentaje de oxidación con 0.13%. Mientras que, la con D₃ (25 explantes) mostró el mayor porcentaje de oxidación con 0.94%.

El factor tipo de explante evidenció significancia en sus niveles. Los tratamientos con yemas apicales (E_1) presentaron el menor porcentaje de oxidación con 0.26% en el rango a. Mientras que, los tratamientos con yemas laterales (E_2) mostraron el mayor porcentaje de oxidación con 0.88% en el rango b.

Los niveles del factor variedad evidenciaron diferencias significativas. V_1 presentó el menor porcentaje de oxidación con 0.31% en el rango a. Mientras que, V_2 mostró el mayor porcentaje de oxidación con 0.84% en el rango b.

Tabla 17.

*Prueba de Significancia y Comparación de Medias para el porcentaje de oxidación en la micropropagación de *Vaccinium corymbosum* Linnaeus con SIT's-RITA.*

Factores	Descripción	Porcentaje de Oxidación (%)	Porcentaje de Oxidación (%) ⁽¹⁾
Densidad (D)	D_1 = 5 explantes	0.22	0.13 a
	D_2 = 15 explantes	1.14	0.65 ab
	D_3 = 25 explantes	1.63	0.94 b
Tipo de Explante (E)	E_1 = yema apical	0.45	0.26 a
	E_2 = yema lateral	1.54	0.88 b
Variedad (V)	V_1 = Variedad 1	0.53	0.31 a
	V_2 = Variedad 2	1.46	0.84 b

Nota. Los datos con letras diferencias expresan estadísticamente diferencias significativas. (1) Datos transformados con la función arcoseno.

En la interacción densidad de siembra y tipo de explante, la D_3 (25 explantes) y E_2 (yemas laterales) mostraron un alto porcentaje de oxidación con 1.39%. Mientras que, D_1 (5 explantes) y E_2 (yemas laterales) no presentaron oxidación (Tabla 18).

En la interacción densidad de siembra y variedad de arándano, los tratamientos V₁ y D₁ (5 explantes) no mostraron oxidación. Mientras que, los tratamientos V₂ y D₃ (25 explantes) presentaron el mayor porcentaje de oxidación con 1.76% (Tabla 18).

En la interacción variedad de arándano y tipo de explante, V₁ con E₁ (yemas apicales) no mostraron oxidación. Mientras que, V₂ con E₂ (yemas laterales) presentaron el mayor porcentaje de oxidación con 1.15% (Tabla 18).

Tabla 18.

Prueba de Significancia y Comparación de Medias, interacción de factores, para el porcentaje de oxidación en la micropropagación de Vaccinium corymbosum Linnaeus con SIT's-RITA.

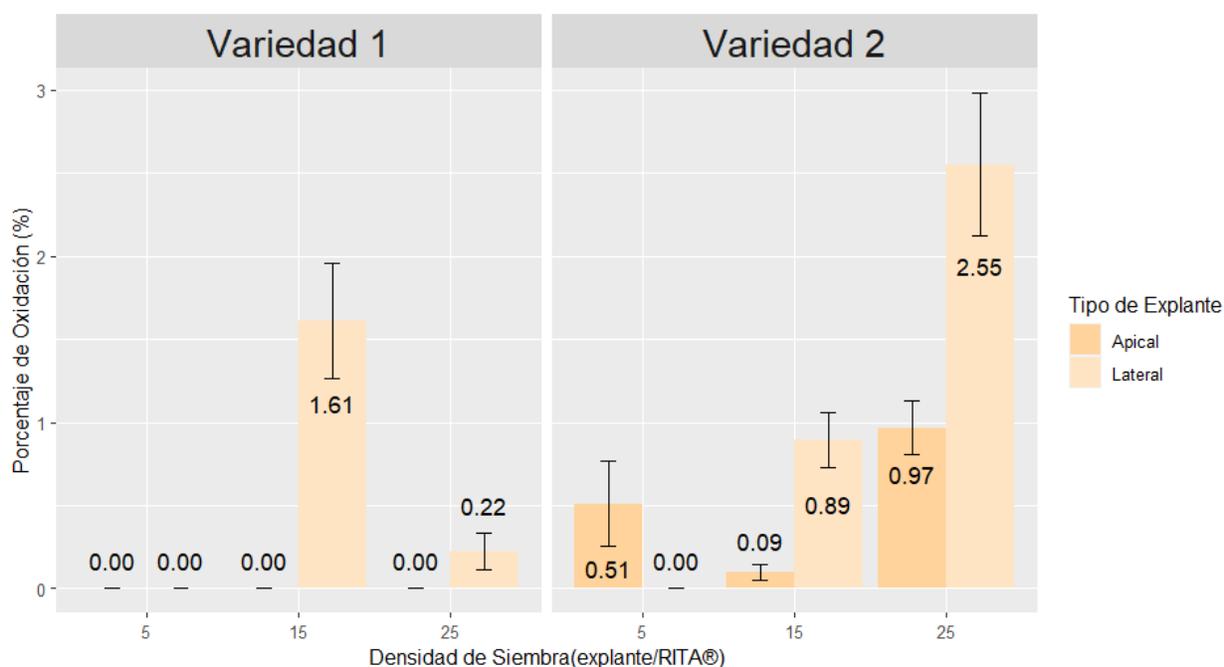
Factores	Descripción	Porcentaje de Oxidación (%)	Porcentaje de Oxidación (%) ⁽¹⁾
DxE	5 explantes + yema apical	0.44	0.26 a
	5 explantes + yema lateral	0.00	0.00 a
	15 explantes + yema apical	0.09	0.049 a
	15 explantes + yema lateral	2.18	1.25 bc
	25 explantes + yema apical	0.84	0.48 ab
	25 explantes + yema lateral	2.42	1.39 c
VxD	Variedad 1 + 5 explantes	0.00	0.00 a
	Variedad 1 + 15 explantes	1.41	0.81 a
	Variedad 1 + 25 explantes	0.20	0.11 a
	Variedad 2 + 5 explantes	0.45	0.26 a
	Variedad 2 + 15 explantes	0.86	0.49 a
	Variedad 2 + 25 explantes	3.07	1.76 b
VxE	Variedad 1 +Yema apical	0.00	0.00
	Variedad 1 +Yema lateral	1.07	0.61
	Variedad 2 + Yema apical	0.92	0.53
	Variedad 2 + Yema lateral	2.00	1.15

Nota. Los datos con letras diferencias expresan estadísticamente diferencias significativas. (1) Datos transformados con la función arcoseno. Densidad de Siembra (D), Tipo de Explante (E), Variedad de arándano (V).

En la Figura 17, se observa la influencia de la interacción de los tres factores de estudio en la micropropagación de dos variedades de arándano con SIT's-RITA. El tratamiento T_{2.6} mostró el mayor porcentaje de oxidación con 2.55%. En los tratamientos T_{1.1}, T_{1.2}, T_{1.3}, T_{1.5}, T_{1.6} no hay significancia estadística y presentan los porcentajes de oxidación más bajos.

Figura 17.

Efecto de la densidad de siembra, tipo de explante y variedad de Vaccinium corymbosum Linnaeus en el porcentaje de brotes viables con SIT's-RITA.

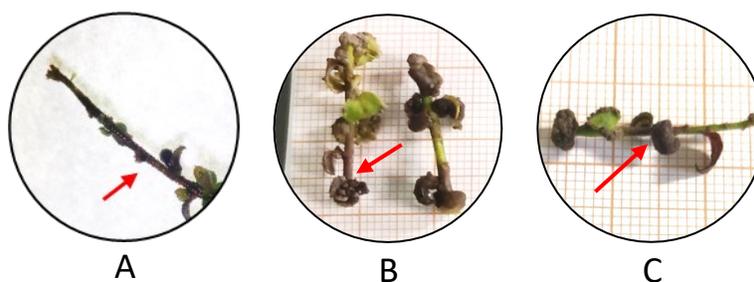


Nota. En la figura se puede observar la presencia de oxidación en los brotes cultivados en SIT's-RITA tras 40 días de su siembra. Los tratamientos para la V₁: T_{1.1} (5 explantes, yemas apicales), T_{1.2} (5 explantes, yemas laterales), T_{1.3} (15 explantes, yemas apicales), T_{1.4} (15 explantes, yemas laterales), T_{1.5} (25 explantes, yemas apicales), T_{1.6} (5 explantes, yemas apicales). Los tratamientos para la V₂: T_{2.1} (5 explantes, yemas apicales), T_{2.2} (5 explantes, yemas laterales), T_{2.3} (15 explantes, yemas apicales), T_{2.4} (15 explantes, yemas laterales), T_{2.5} (25 explantes, yemas apicales), T_{2.6} (5 explantes, yemas apicales).

En la Figura 18 se puede observar explantes con síntomas de oxidación en el tallo u hojas. Donde, en la sección A corresponde a un explante proveniente del tratamiento T_{2.4} el cual posee tejido ennegrecido a lo largo de su tallo. En sección B se visualiza dos explantes oxidados y con formación de callo, correspondientes al tratamiento T_{1.4}. En la sección C se puede observar hojas oxidadas pertenecientes al tratamiento T_{2.1}.

Figura 18.

Influencia de los Sistemas de Inmersión Temporal en la oxidación de explantes en la micropropagación de Vaccinium corymbosum Linnaeus.

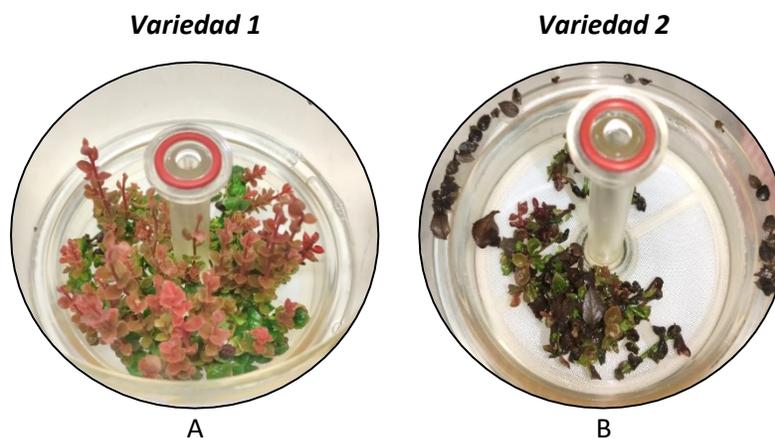


Nota. Las flechas se direccionan a las zonas del explante con oxidación del tejido.

En la Figura 19, se puede observar que para el tratamiento T_{2.6}, a los 40 días de cultivo, donde se evidenció alta tasa de defoliación de los explantes en comparación con los tratamientos para el tratamiento T_{1.6}.

Figura 19.

Micropropagación de dos variedades de Vaccinium corymbosum Linnaeus.



Nota. Comparación en la micropropagación de *Vaccinium corymbosum* Linnaeus, en SIT's tras 40 días de cultivo. (A) Cero defoliaciones en tratamiento con 25 explantes para V₁. (B) Alta defoliación en tratamiento con 25 explantes para V₂.

Porcentaje de Hiperhidratación

Para esta variable los datos se ajustaron a la normalidad con la transformación arcoseno (%). En la micropropagación de arándano en SIT's-RITA, el porcentaje de hiperhidratación mostró diferencias significativas en los niveles de los factores densidad de siembra y variedad de arándano, y, en la interacción de ambos factores (Tabla 19 del ANOVA).

Tabla 19.

ANOVA para el porcentaje de hiperhidratación en la micropropagación de Vaccinium corymbosum Linnaeus con SIT's-RITA.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Error cuadrático medio	Valor F	Pr (>F)
Total	47			
Tratamientos	11			
Densidad de Siembra (D)	2	14.81	3.28	0.05*
Tipo de Explante (E)	1	1.60	0.35	0.55 ^{ns}
Variedad de Arándano (V)	1	41.88	9.26	4.35E-03*
DxE	2	1.24	0.27	0.76 ^{ns}
DxV	2	27.80	6.15	5.04E-03*
ExV	1	0.73	0.16	0.69 ^{ns}
DxExV	2	1.36	0.36	0.70 ^{ns}
Promedio	36			
Coeficiente de Variación		170.21		

Nota. (ns): No significativo, (*) Significativo.

La prueba de significancia y comparación de medias para el porcentaje de hiperhidratación en la micropropagación de arándano con SIT's-RITA se muestra en la Tabla 20. El factor tipo de explante no presentó diferencias significativas en sus niveles al igual que la interacción densidad de siembra y tipo de explante.

Las densidades de siembra D₂ (15 explantes) y D₃ (25 explantes) presentaron el menor porcentaje de hiperhidratación con 0.73% y 0.76%, respectivamente y se ubican en el mismo rango. Mientras que, la densidad de siembra D₁ mostró el mayor porcentaje de hiperhidratación con 2.36% y se ubica en el rango inferior (Tabla 20).

Las variedades de arándano fueron significativamente diferentes en sus niveles. V_1 presentó el menor porcentaje de hiperhidratación con 0.32% en el rango a. Mientras que, V_2 evidenció el mayor porcentaje de hiperhidratación con 2.18% en el rango b (Tabla 20).

Tabla 20.

*Prueba de Significancia y Comparación de Medias para el porcentaje de hiperhidratación en la micropropagación de *Vaccinium corymbosum* Linnaeus con SIT's-RITA.*

Factores	Descripción	Porcentaje de Hiperhidratación (%)	Porcentaje de Hiperhidratación (%) ⁽¹⁾
Densidad (D)	D ₁ = 5 explantes	4.09	2.36 b
	D ₂ = 15 explantes	1.32	0.63 a
	D ₃ = 25 explantes	1.10	0.76 a
Tipo de Explante (E)	E ₁ = yema apical	1.85	1.07
	E ₂ = yema lateral	2.49	1.43
Variedad (V)	V ₁ = Variedad 1	3.79	0.32 a
	V ₂ = Variedad 2	0.55	2.18 b

Nota. Los datos con letras diferencias expresan estadísticamente diferencias significativas. (1) Datos transformados con la función arcoseno.

En la interacción variedad de arándano y densidad de siembra, los tratamientos V_2 y D_1 (5 explantes) presentaron el mayor porcentaje de hiperhidratación con 4.72%. Mientras que, los tratamientos V_1 y D_1 (5 explantes) no mostraron signos de hiperhidratación (Tabla 21).

En la interacción variedad de arándano y tipo de explante, los tratamientos V_1 y E_1 (yemas apicales) presentaron el menor porcentaje de hiperhidratación con 0.01%. Mientras que, los tratamientos V_2 y E_2 (yemas laterales) mostraron el mayor porcentaje de hiperhidratación con 2.24%.

Tabla 21.

Prueba de Significancia y Comparación de Medias, interacción de factores, para el porcentaje de hiperhidratación en la micropropagación de Vaccinium corymbosum Linnaeus con SIT's-RITA.

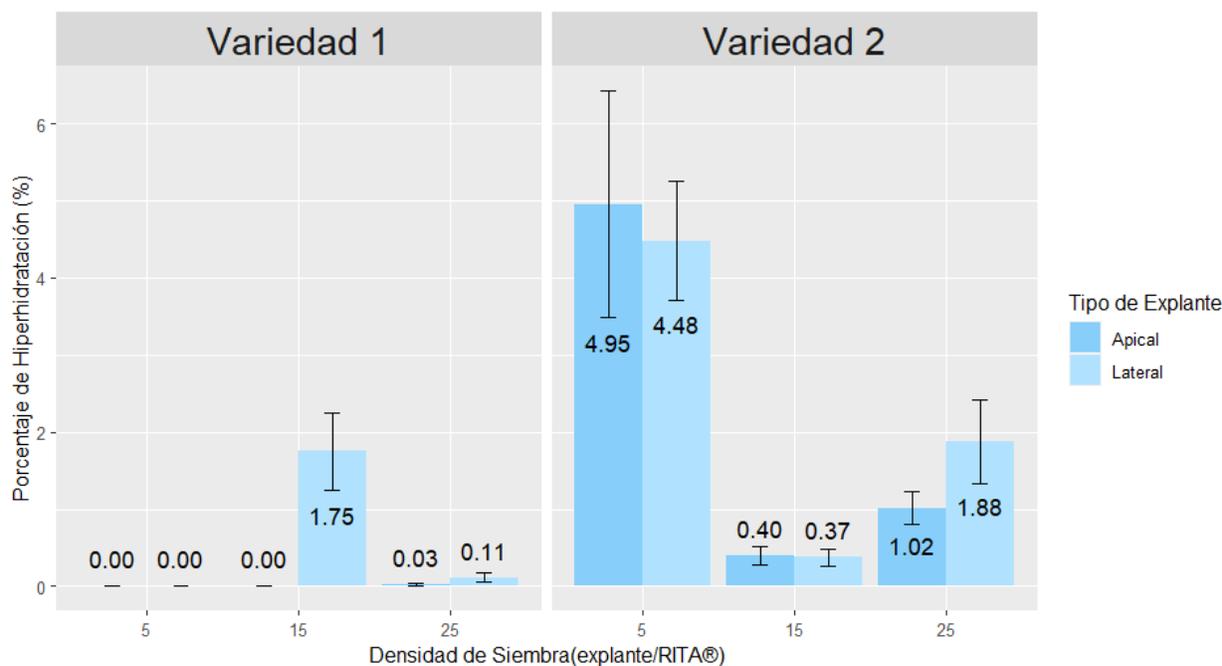
Factores	Descripción	Porcentaje de Hiperhidratación (%)	Porcentaje de Hiperhidratación (%) ⁽¹⁾
DxE	5 explantes + yema apical	4.29	2.48
	5 explantes + yema lateral	3.89	2.24
	15 explantes + yema apical	0.35	0.2
	15 explantes + yema lateral	1.85	1.06
	25 explantes + yema apical	0.91	0.52
	25 explantes + yema lateral	1.74	0.99
VxD	Variedad 1 + 5 explantes	0.00	0.00 a
	Variedad 1 + 15 explantes	1.53	0.87 a
	Variedad 1 + 25 explantes	0.12	0.07 a
	Variedad 2 + 5 explantes	8.19	4.72 b
	Variedad 2 + 15 explantes	0.67	0.39 a
	Variedad 2 + 25 explantes	2.53	1.45 a
VxE	Variedad 1 +Yema apical	0.01	0.01
	Variedad 1 +Yema lateral	1.08	0.62
	Variedad 2 + Yema apical	3.69	2.12
	Variedad 2 + Yema lateral	3.90	2.24

Nota. Los datos con letras diferencias expresan estadísticamente diferencias significativas. (1) Datos transformados con la función arcoseno. Densidad de Siembra (D), Tipo de Explante (E), Variedad de arándano (V).

En la Figura 20, se muestra la influencia de los tres factores del estudio en la micropropagación de arándano en SIT's-RITA. Los tratamientos T_{2.1} y T_{2.2} presentaron mayor porcentaje de hiperhidratación con 4.95% y 4.48%, respectivamente. Mientras que, los tratamientos T_{1.1}, T_{1.2} y T_{1.3} no mostraron hiperhidratación.

Figura 20.

Efecto de la densidad de siembra, tipo de explante y variedad de arándano en el porcentaje de hiperhidratación en la micropropagación con SIT's-RITA

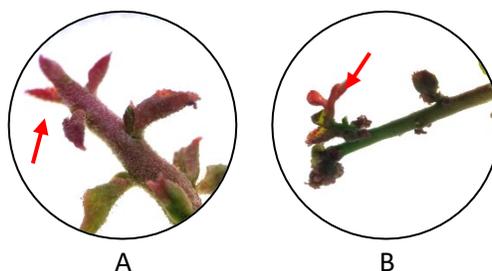


Nota. En la figura se puede observar la presencia de oxidación en los brotes cultivados en SIT's-RITA tras 40 días de su siembra. Los tratamientos para la V₁: T_{1.1} (5 explantes, yemas apicales), T_{1.2} (5 explantes, yemas laterales), T_{1.3} (15 explantes, yemas apicales), T_{1.4} (15 explantes, yemas laterales), T_{1.5} (25 explantes, yemas apicales), T_{1.6} (5 explantes, yemas apicales). Los tratamientos para la V₂: T_{2.1} (5 explantes, yemas apicales), T_{2.2} (5 explantes, yemas laterales), T_{2.3} (15 explantes, yemas apicales), T_{2.4} (15 explantes, yemas laterales), T_{2.5} (25 explantes, yemas apicales), T_{2.6} (5 explantes, yemas apicales).

En la Figura 21 se muestra material vegetal hiperhidratado en la micropropagación de arándano con SIT's-RITA a 40 días de cultivo. En la sección A y B, se puede observar una yema apical y brote axilar con síntomas de hiperhidratación.

Figura 21.

Brotes hiperhidratados encontrados en la micropropagación de Vaccinium corymbosum Linnaeus en SIT's-RITA.



Nota. Explantes hiperhidratados a los 40 días de cultivo en SIT's-RITA. (A) Yema apical hiperhidratada.

(B) Brote axilar hiperhidratado.

Una vez detallados todos los resultados obtenidos en la micropropagación de arándano en SIT's-RITA se menciona el tratamiento con mejor respuesta frente a la tecnología de cada variedad. Para la variedad V_1 , el tratamiento $T_{1.3}$ (15 explantes, yemas apicales) mostró mayor coeficiente de multiplicación, brotes con longitud superior a los 19 mm, 90% de brotes viables, sin evidencia de oxidación ni hiperhidratación. Mientras que, para la variedad V_2 , el tratamiento $T_{2.4}$ mostró altas tasas de proliferación (3.88 brotes/explante), longitud promedio de 10.61 mm, 77.23% de brotes viables, 0.89% de oxidación y 0.37% de hiperhidratación.

Fase 2: Micropropagación de *Vaccinium corymbosum* Linnaeus en el Sistema Convencional

Como segunda etapa, se evaluó el protocolo estandarizado de la multiplicación del género *Vaccinium* establecido por INIAP para las dos variedades de arándano en medio semisólido. Para posteriormente contrastar con los mejores tratamientos en SIT's-RITA. Se evaluaron las mismas variables de respuesta en la etapa anterior.

En el sistema convencional la variable porcentaje de brotes viables fue del 100%. Además, no se mostraron anomalías morfológicas de oxidación e hiperhidratación. Por lo que no se realizó análisis estadístico de estas tres variables.

Coefficiente de Multiplicación

Los datos de esta variable siguieron una distribución normal. Los niveles de los factores tipo de sistema de micropropagación y variedad de arándano, y, la interacción de ambos, mostraron diferencias significativas (Tabla 22 del ANOVA).

Tabla 22.

Análisis de varianza para el coeficiente de multiplicación in vitro de Vaccinium corymbosum Linnaeus.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Error cuadrático medio	Valor F	Pr (>F)
Total	15			
Tratamientos	3			
Tipo de Sistema de Micropropagación	1	40.64	17.79	0.00119*
Variedad de Arándano	1	35.5	15.54	0.00196*
SxV	1	13.75	6.019	0.0304*
Error	12			
Coeficiente de Variación		32.12		

Nota: (*): significativo

La prueba de significancia y comparación de medias para el coeficiente de multiplicación en la micropropagación de arándano en ambos sistemas se muestra en la Tabla 23. El sistema SIT's-RITA mostró el mayor coeficiente de multiplicación con 6.30 brotes/explante en el rango a. Mientras que, el sistema convencional presentó un coeficiente de multiplicación de 3.11 brotes/explante en el rango b.

En el factor variedad de arándano, V_1 presentó el mayor coeficiente de multiplicación con 6.20 brotes/explantes con el rango a. Mientras que, V_2 evidenció un coeficiente multiplicación menor con 3.21 brotes/explante con el rango b (Tabla 23).

En la interacción del tipo de sistema de micropropagación y variedad de arándano, el tratamiento $T_{S,1}$ (SIT's-RITA, V_1) mostró un mayor coeficiente de multiplicación con 8.71 brotes/explante con el rango a. Mientras que, V_2 en SIT's-RITA presentó el menor coeficiente de multiplicación con 3.88 brotes/explante con el rango b. De igual manera, los tratamientos en el sistema convencional presentaron un menor coeficiente de multiplicación con 3.68 brotes/explante para V_1 y 2.55 brotes/explante para V_2 , ambas en el rango b (Tabla 23).

Tabla 23.

Prueba de significancia y medias para la micropropagación de Vaccinium corymbosum Linnaeus.

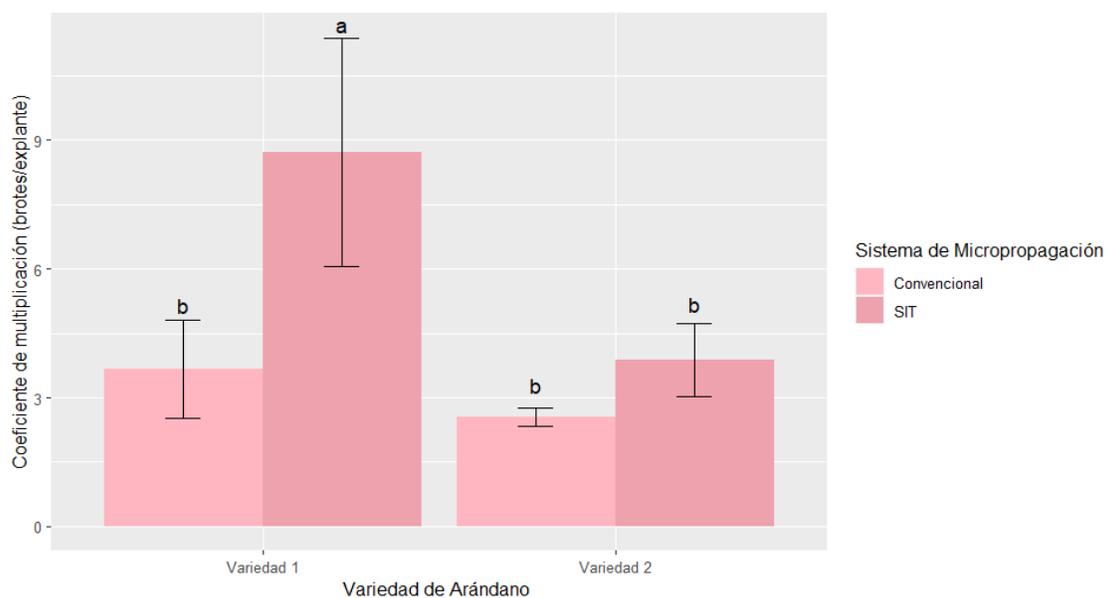
Factores	Descripción	Coefficiente de Multiplicación (brotes/explantes)
Sistema de Micropropagación (S)	S_1 = SIT's	6.30 a
	S_2 = Convencional	3.11 b
Variedad (V)	V_1 = Variedad 1	6.20 a
	V_2 = Variedad 2	3.21 b
S x V	$T_{S,1}$ = SIT's + Variedad 1	8.71 a
	$T_{S,2}$ = SIT's + Variedad 2	3.88 b
	$T_{S,3}$ = Convencional + Variedad 1	3.68 b
	$T_{S,4}$ = Convencional + Variedad 2	2.55 b

Nota. Los datos con letras diferencias expresan estadísticamente diferencias significativas.

En la Figura 22, se observa la micropropagación de arándano en SIT's-RITA y convencional. La variedad V_1 en SIT's-RITA mostró un coeficiente de multiplicación superior (8.71 brotes/explante) a V_1 en sistema convencional (3.68 brotes/explante). Mientras que, el coeficiente de multiplicación de V_2 en SIT's-RITA no difirió con V_2 en sistema convencional.

Figura 22.

Coefficiente de Multiplicación en la micropropagación Vaccinium corymbosum Linnaeus en el dos sistemas de micropropagación.

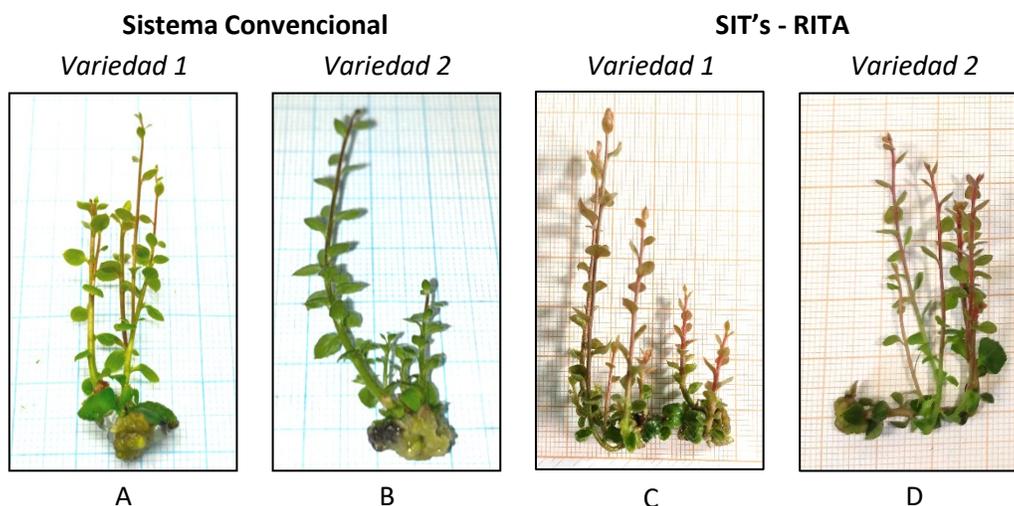


Nota. En la figura se puede observar la proliferación de brotes en ambos sistemas de micropropagación de *Vaccinium corymbosum* Linnaeus. Los tratamientos para la V₁: T_{S,1} (SIT's) y T_{S,3} (convencional). Para V₂: T_{S,2} (SIT's) y T_{S,4} (Convencional).

En la Figura 23 se puede observar la proliferación de brotes para ambos sistemas. Se evidencia la diferencia en la proliferación de brotes entre los dos tipos de sistema de micropropagación de *Vaccinium corymbosum* Linnaeus.

Figura 23.

Coficiente de Multiplicación para las dos variedades de Vaccinium corymbosum Linnaeus.



Nota. En la figura se observa el desarrollo de brotes en la micropropagación de *Vaccinium corymbosum* Linnaeus por dos sistemas diferentes de propagación.

Longitud de Brote

Para esta variable los datos siguieron una distribución normal. Se evidenció que existen diferencias significativas para el tipo de sistema de micropropagación y variedad de arándano. Sin embargo, su interacción no presentó diferencias significativas (Tabla 24 del ANOVA).

Tabla 24.

Análisis de varianza para el coeficiente de multiplicación in vitro de Vaccinium corymbosum Linnaeus

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Error cuadrático medio	Valor F	Pr (>F)
Total	15			
Tratamientos	3			
Sistema de Propagación	1	677.6	32.12	0.000104*
Variedad de Arándano	1	273.8	12.98	0.00363*
SxV	1	1.7	0.082	0.779 ^{ns}
Error	12			
Coeficiente de Variación		21.27		

Nota. (ns): No significativo (*): significativo

El análisis de significancia y comparación de medias para la longitud de brote se muestra en la Tabla 25. La micropropagación de arándano en medio de cultivo semisólido mostró una longitud de brote mayor con 28.09 mm en el rango a. Mientras que, en SIT's-RITA se obtuvo la menor longitud de brote con 15.08 mm en el rango b.

En el factor variedad de arándano, V_1 alcanzó longitudes de brotes superiores a 25 mm. Mientras que, V_2 no superó los 18 mm de largo. En la interacción de ambos factores se mostró que el tratamiento $T_{C.1}$ presentó una mayor longitud de brote con 31.9 mm. Para el tratamiento $T_{S.2}$ se evidenció longitud de brote menores con 10.61 mm.

Tabla 25.

Prueba de significancia y medias para la longitud de brote en la micropropagación Vaccinium corymbosum Linnaeus

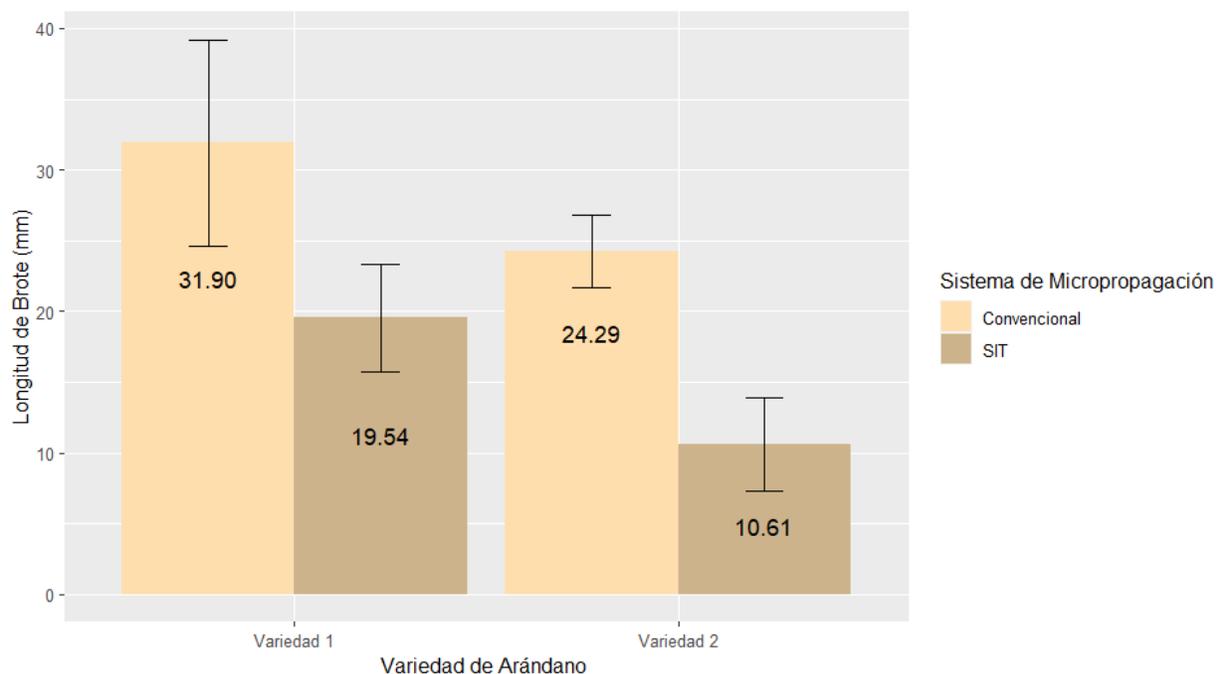
Factores	Descripción	Longitud de Brotes (mm)
Tipo de Sistema de micropropagación (S)	S_1 = SIT's	15.08 b
	S_2 = Convencional	28.09 a
Variedad (V)	V_1 = Variedad 1	25.72 a
	V_2 = Variedad 2	17.45 b
S x V	$T_{S.1}$ = SIT's + Variedad 1	19.54
	$T_{S.2}$ = SIT's + Variedad 2	10.61
	$T_{C.1}$ = Convencional + Variedad 1	31.90
	$T_{C.2}$ = Convencional + Variedad 2	24.29

Nota. Los datos con letras diferencias expresan estadísticamente diferencias significativas.

En la Figura 24 se puede observar la influencia de la micropropagación de *Vaccinium corymbosum* Linnaeus en dos sistemas de producción de *vitro* plantas. Donde se evidenció que los tratamientos en el sistema convencional alcanzaron mayores longitudes de brotes con 31.90 mm para V_1 y 24.29 mm para V_2 , a pesar de que no hubo diferencias estadísticas.

Figura 24.

Longitud de Brote para la micropropagación de Vaccinium corymbosum Linnaeus

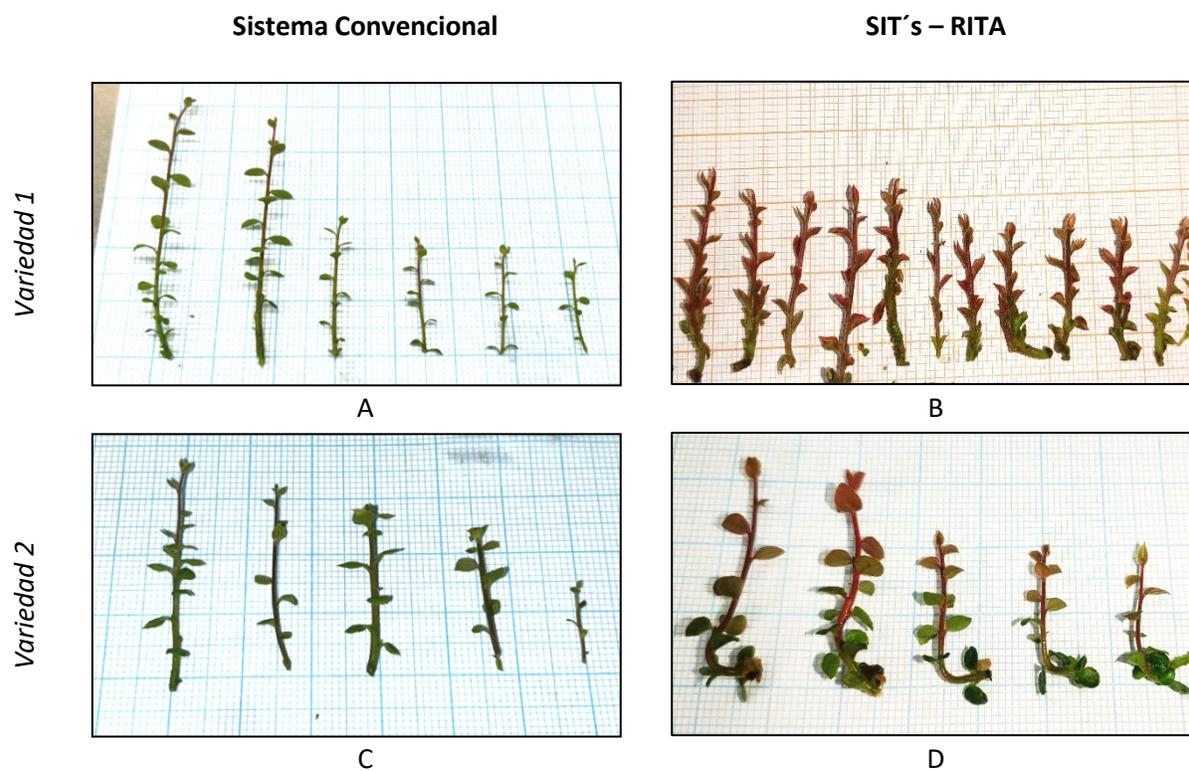


Nota. En la figura se puede observar la longitud de brotes en ambos sistemas de micropropagación de *Vaccinium corymbosum* Linnaeus. Los tratamientos para la V₁: T_{S,1} (SIT's-RITA) y T_{S,3} (convencional). Para V₂: T_{S,2} (SIT's) y T_{S,4} (Convencional).

En la Figura 25, se puede visualizar la longitud de brotes para las dos variedades de arándano establecidas en SIT's-RITA y en sistema convencional.

Figura 25.

Longitud de Brotes de dos variedades de Vaccinium corymbosum Linnaeus



Nota. En la figura se observa la longitud de brotes en la micropropagación de *Vaccinium corymbosum*

Linnaeus por dos sistemas diferentes.

Capítulo V: Discusión

Una vez descritas las diferentes respuestas de las dos variedades de arándano frente al uso de sistemas de inmersión temporal para la micropropagación, en este capítulo se discutirá las causas de los resultados obtenidos con base en los dos factores que se estudiaron y su interacción.

Uno de los parámetros físicos que influyen en la optimización de la micropropagación vegetal en SIT's es la densidad de siembra o inóculo inicial (Yang et al., 2010). Los tratamientos con la densidad D₂ (15 explantes) mostraron brotes más largos con (15.81 mm). Esto se contrasta con el estudio de Ross & Castillo (2009), quienes a la misma densidad de siembra bajo el sistema RITA® logran longitudes de brotes de 6.05 mm en la micropropagación de la variedad de arándano "Georgina Gem". Por otro lado, Kunakhonnuruk (2018) menciona que el aumento en la densidad de siembra en los SIT's conduce a la disminución de las tasas de crecimiento.

Se podría pensar que al aumentar el inóculo se puede generar un incremento del coeficiente de multiplicación. Sin embargo, se pudo evidenciar que con la densidad de 25 explantes la tasa de proliferación de brotes disminuye en las dos variedades de arándano. Goyes & Rojas (2021) en su protocolo de propagación *in vitro* para *Vaccinium corymbosum* Linnaeus, con 20 explantes como densidad inicial en SIT's, alcanzaron una tasa de multiplicación de 3.4 brotes/explante. Sin embargo, a diferencia de lo anterior, se obtuvo un mayor coeficiente (8.72 brotes/explante) con el inóculo de 15 explantes. Williams (1995) sostiene que la interacción entre los tejidos vegetales y el medio de cultivo puede provocar cambios en el pH ya sea por la absorción o la exudación de sustancias. Esta liberación de exudados puede provocar la reducción del número de brotes debido al agotamiento y competencia de nutrientes (Aicha et al., 2014). Estas afirmaciones permiten entender el hecho de que los tratamientos con mayor inóculo de siembra hayan presentado menores coeficientes de multiplicación.

La oxidación del material vegetal fue un problema evidente en los tratamientos establecidos en la micropropagación de arándano bajo el sistema RITA®. Para las densidades de 15 y 25 explantes se evidenció un alto porcentaje de oxidación con 0.65% y 0.94%, respectivamente. Lyam et al. (2012) mencionan que en un cultivo *in vitro* denso, tanto la tasa de aireación como la circulación de oxígeno no es equitativo para todo el material vegetal, lo que tiende a oxidar al explante.

En los tratamientos con la variedad V₂ y 25 explantes se observó la defoliación excesiva dentro de los SIT's-RITA (Figura 19). Una de las razones a este hallazgo puede ser el cizallamiento provocado por el impulsor y las burbujas que estallan dentro del RITA (Valdiani et al., 2019). Para lo cual Fowler (2000) menciona que las lesiones en el tejido vegetal libera en el medio de cultivo enzimas oxidasas, como las tirosinasas, las cuales provocan el ennegrecimiento del tejido, seguido de la inhibición del crecimiento y tras ello la necrosis. De manera que se puede decir que la variedad V₂ es más sensible a este tipo de biorreactor, en comparación a V₁.

Durante el proceso de oxidación la intervención de radicales libres de superóxido, hidroxilo y peróxido de hidrógeno conocidas como especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) han demostrado causar estrés oxidativo dentro del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* (Saher et al., 2004). El aumento de las ROS provoca la oxidación de las proteínas, ácidos grasos insaturados y ADN, lo que causa daño celular y finalmente la muerte (Mendonça et al., 2016). Vasconcelos et al. (2012) mencionan que la alta concentración de las ROS y la actividad enzimática del sistema antioxidante han reflejado una relación entre el estrés oxidativo y la hiperhidratación. Por lo tanto, estos argumentos permiten entender la relación entre porcentajes de ambas variables evaluadas después de los 40 días de cultivo en los SIT's-RITA. El porcentaje de hiperhidratación para los tratamientos con el menor inóculo de siembra (5 explantes) con V₂ llegó a ser el porcentaje más alto (4.72%). Rojas (2010) manifiesta que una excesiva disponibilidad de agua en el medio junto al aumento de humedad relativa altera el equilibrio hídrico dentro de la planta provocando consigo la hiperhidratación de los tejidos.

Los resultados de este estudio indican que la densidad de siembra con mejores resultados fue el de 15 explantes por frasco RITA®. Para V₁, se observa un comportamiento ideal en SIT's donde esta densidad presenta el mayor coeficiente de multiplicación (8.72 brotes/explantes) y longitud de brotes (19.54 mm) y, a su vez, el porcentaje de oxidación e hiperhidratación son bajos (0%). Sin embargo, es interesante notar que en V₂, a pesar de que la longitud y proliferación de brotes es mayor con el inóculo inicial de 15 explantes, se evidencian altos porcentajes de oxidación e hiperhidratación. Como se mencionaba algunas posibles explicaciones para esto podría ser la existencia de un estrés oxidativo por la formación de un cultivo denso, donde intervienen escasas tasas de aireación y existencia de ROS.

El tipo de explante, por otro lado, es un factor que influye potencialmente en la optimización de los SIT's. En la micropropagación de arándano, el desarrollo de yemas axilares ha sido el mecanismo más aplicado y fiable (Debnath, 2007). Sin embargo, Akdemir et al. (2014) mencionó que para la utilidad de los sistemas de inmersión es necesario optimizarlos tanto para la variedad vegetal como el tipo de explante dentro de una misma especie. En este proyecto, se pudo observar que para la variedad V₁ los tratamientos con yemas apicales mostraron mejores resultados. Mientras que para la variedad V₂, las yemas laterales mostraron mejor respuesta en los SIT's-RITA.

La producción de auxinas endógenas ha demostrado ser responsable de la dominancia apical, proceso donde el crecimiento del ápice de los brotes inhibe el desarrollo de las yemas axilares (Cline, 1991; Dun et al., 2006). Un método para aumentar la ramificación de brotes es eliminar el ápice con el objetivo de disminuir este proceso (George & Hall, 2008; Xie et al., 2010). En la interacción de la variedad V₂ con yemas laterales se observó mayor coeficiente de multiplicación (2.78 brotes/explantes), sin embargo, los brotes no fueron los más altos (8.26 mm). Estos resultados coinciden con los observados en el estudio de Debnath & Mcrae (2010) quienes señalan que la presencia de zeatina en el medio de cultivo aumentó el número de brotes por explante, no obstante su altura fue menor en la propagación de *Vaccinium vitis-idea* L. Además, Debnath & McRae (2001) encontraron que la tasa más

alta de regeneración de brotes, para sus dos cultivares de *Vaccinium*, se obtiene con segmentos nodales que con yemas apicales.

Para el caso de V₁, no se evidenció diferencias entre el tipo de explante para el coeficiente de multiplicación, sin embargo, se pudo observar un mayor desarrollo en la longitud del brote apical sin proliferación de brotes axilares. Este resultado puede explicarse por la dominancia apical causada por la concentración endógena de auxinas (Tanaka et al., 2006). A su vez, Dierck et al. (2016) mencionan que las estrigolactonas también llegan a controlar la ramificación de los brotes por lo que se las ha considerado como mensajeros secundarios. De manera que la participación endógena de estas dos fitohormonas pudo ser la causa de la escasa proliferación de brotes axilares en los explantes con yemas apicales.

Se puede evidenciar que las dos variedades de arándano tuvieron diferente desarrollo en los SIT's. De manera que, en función de los resultados obtenidos en este estudio se reconoce que el factor del genotipo es influyente en la propagación *in vitro*. Debnath (2007) menciona que la respuesta *in vitro* entre genotipos de arándano highbush va a ser diferente tanto en la regeneración como el desarrollo de brotes. Los niveles endógenos de hormonas y la afinidad de receptores o su sensibilidad celular a los reguladores de crecimiento pueden variar entre las células de una misma planta.

En el estudio realizado por Scalzo et al. (2016) los resultados obtenidos en la micropropagación de cinco variedades de arándano, se vinculan estrictamente con factores como el genotipo y medio de cultivo, siendo la variedad Blue Bayou (*Vaccinium corymbosum* híbrido) la que presentó mayores indicadores de proliferación de plantas (longitud de brote, número de nudos y brotes por planta individual). A su vez Litwińczuk (2012) recomienda la optimización de las condiciones de cultivo por genotipo de forma separada, debido a la variación de los cultivares de *Vaccinium* spp. en respuesta a concentraciones de fitohormonas y sales. En el estudio de Debnath (2017) ha evaluado siete genotipos

de arándanos bajo dos sistemas de biorreactores, afirmando que la proliferación de brotes dentro de estos sistemas depende del genotipo, puesto que sólo dos genotipos (“S3” y “S5”) alcanzaron 30 brotes/explante, siendo superiores al resto.

Como se detalló anteriormente, en la etapa de micropropagación de las dos variedades de arándano bajo los SIT's se evidenció que para V_1 y V_2 la mayor proliferación de brotes viables se obtuvieron con la densidad inicial de 15 explantes. Mientras que, el desarrollo de brotes a partir de yemas apicales fue superior en V_1 , a diferencia de V_2 donde las yemas laterales ejercen un efecto positivo en la proliferación de brotes.

A continuación, se discutirá la relación entre los sistemas convencionales con los SIT's-RITA.

A pesar de que en la micropropagación de varios cultivos de tejido vegetal es común el uso de medios gelificados, para alcanzar una actividad comercial se debe recurrir de tecnologías que automaticen esta etapa. El medio líquido presenta varias ventajas, una de ellas es el aumento de superficie de absorción de nutrientes, mientras que, en el método convencional existe la difusión de nutrientes por un solo punto de contacto entre el explante y el medio de cultivo (Castillo et al., 2019). Debnath & Arigundam (2020) mencionan que en los biorreactores el tejido esta siempre en contacto con el medio de cultivo permitiendo el desarrollo uniforme de los brotes y estimulando el rápido crecimiento. El efecto positivo del uso de biorreactores en la micropropagación de ambas variedades de arándano llega a ser evidente en el presente proyecto. Donde V_1 alcanzó 8.72 brotes/explante, el cual supera en un 60% con 20 días de diferencia al sistema convencional. Para el caso de V_2 , el uso de este sistema automatizado originó una tasa de proliferación de 3.88 brotes/explante, aumentando la tasa de proliferación en un 36% en contraste con los tratamientos en medio de cultivo semisólido. Estos resultados corroboran la idea de Watt (2012) quien afirma que en el uso de SIT's se alcanza mayor proliferación de biomasa en menor tiempo de cultivo en comparación a las técnicas convencionales.

La alta tasa de multiplicación en SIT's-RITA se debe a la ausencia de agar en el medio de cultivo, el mismo que puede contener impurezas inorgánicas que interfieren en la velocidad de difusión de nutrientes y por lo tanto limita la proliferación de la planta (Leifen et al., 1995). Esta es una de las razones por lo que los cultivos *in vitro* en medio semisólido tienden a requerir mayor tiempo de cultivo a comparación de los SIT's-RITA. En el estudio de Debnath (2009), con un enfoque similar al presente proyecto, obtiene resultados para tres genotipos de *Vaccinium*, donde el número de brotes bajo el sistema de cultivo líquido fue tres veces mayor que con el medio gelificado. Otro reporte es el de Arencibia et al. (2013) quienes logran una mayor propagación de tres cultivares de arándano con los SIT's en comparación con el sistema convencional. En la micropropagación de ambas variedades de arándano, en este proyecto, se evidenció que para la variedad V1 se logró aumentar el coeficiente de multiplicación en 57.79%, y para V2 se alcanzó un coeficiente de multiplicación 34.27% más que el sistema convencional.

El cultivo líquido presenta ciertas limitaciones como el bajo contenido de oxígeno y la hiperhidratación de los brotes (Debnath & Arigundam, 2020). Las dos anomalías fueron presentes dentro de los sistemas de inmersión, los mismos que no se reflejaron con el sistema convencional. Uno de los parámetros que se puede controlar, con el propósito de disminuir o incluso eliminar estos problemas morfológicos, es el ajuste de los tiempos de inmersión. Mordocco et al. (2009) menciona que los ciclos de inmersión deben ajustarse para cada genotipo y tejido debido a la alta variación de tiempos y frecuencias de inmersión. Watt (2012) menciona que la combinación entre tiempos de inmersión cortos junto con extensos tiempos de descanso permitiría solucionar el problema de hiperhidratación en los brotes.

Los brotes de ambas variedades obtenidos por medio semisólido alcanzaron longitudes más altas en comparación a los SIT's. Etienne & Berthouly (2002) señalan que los brotes obtenidos con los SIT's fueron más largos que los obtenidos en medios semisólidos. Estas diferencias pueden explicarse en

parte por la falta de oxidación e hiperhidratación en los sistemas convencionales, los mismos que no interfieren con el desarrollo normal de los brotes. Por otro lado, Monja-Mio et al. (2021) mencionan que para obtener protocolos reproducibles y eficientes es necesario estandarizar el tamaño de los envases. De manera, que el crecimiento de los brotes se verá obstaculizado por la disponibilidad de espacio.

Capítulo VI: Conclusiones y Recomendaciones

Conclusiones

En este estudio se optimizó la micropropagación de las dos variedades comerciales de arándano utilizando los sistemas de inmersión temporal. El coeficiente de multiplicación, a los 40 días de cultivo, para V_1 fue de 8.72 brotes/explante y V_2 alcanzó 3.88 brotes/explante. Los cuales fueron superiores a las tasas de proliferación obtenidas en el sistema convencional con 3.68 brotes/explante y 2.55 brotes/explante, respectivamente.

Para el factor densidad de siembra se evidenció diferencias significativas para densidad de siembra y variedad arándano con un valor P de 1.24E-05 y 2.31E-10, respectivamente. Donde la mayor proliferación de brotes se dio en los tratamientos con densidad de siembra de 15 explantes por frasco RITA[®] para ambas variedades de arándano.

El factor con más influencia en la micropropagación fue la variedad de arándano, las cuales presentaron diferencias significativas, siendo la V_1 la que presentó mayor vigorosidad y mejor desarrollo en comparación a V_2 .

En el factor, tipo de explante, no se evidenció diferencias significativas, sin embargo, para V_1 los mejores resultados se obtuvieron con yemas apicales, mientras que para V_2 con yemas laterales, de manera que no hay una influencia de este factor en la micropropagación en SIT's-RITA.

En el proyecto, el tiempo de inmersión de un minuto con una frecuencia de 4 horas (seis inmersiones por día) originó altos porcentajes de oxidación e hiperhidratación entre las dos variedades de arándano, V_2 presentó el porcentaje más alto con 2.83% de oxidación y 3.41% de hiperhidratación.

Recomendaciones

Con el mejor tratamiento obtenido tanto para V_1 como V_2 , se recomienda evaluar la respuesta de estas *vitro* plantas con este tipo de sistemas en fase de adaptación para completar el estudio.

Así mismo, se sugiere evaluar diferentes tiempos y frecuencias de inmersión, con el fin de disminuir los porcentajes de oxidación e hiperhidratación en los SIT's-RITA para ambas variedades de arándano.

En cuanto a la variedad V_2 de arándano, se propone evaluar otros medios de cultivos para la fase de multiplicación que permitan aumentar las tasas de proliferación de brotes bajo condiciones óptimas.

Investigaciones futuras pueden centrarse en la evaluación de otros factores físicos y químicos, como la luz o diferentes fitohormonas, para identificar la influencia de los mismo en la propagación de brotes de arándano con el propósito de optimizarlos.

Se recomienda evaluar las variables de ambas tecnologías de micropropagación a un mismo tiempo de cultivo, que permitan evaluar la velocidad de crecimiento de las dos variedades de arándanos frente a diferentes condiciones de cultivo.

Capítulo VII: Referencias

- Abrahamian, P., & Kantharajah, A. (2011). Effect of Vitamins on In Vitro Organogenesis of Plant. *American Journal of Plant Sciences*, 02(05), 669–674. <https://doi.org/10.4236/ajps.2011.25080>
- Adelberg, J., & Toler, J. (2004). Comparison of Agar and an Agitated, Thin-film, Liquid System for Micropropagation of Ornamental Elephant Ears. *HortScience*, 39(5), 1088–1092. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.39.5.1088>
- Afreen, F. (2008). Temporary Immersion Bioreactor. *Plan Tissue Culture Engineering*, 187–201. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3694-1_11
- Aguilar, M. E., Garita, K., Kim, Y. W., Kim, J.-A., & Moon, H. K. (2019). Simple Protocol for the Micropropagation of Teak (*Tectona grandis* Linn.) in Semi-Solid and Liquid Media in RITA® Bioreactors and *ex Vitro* Rooting. *American Journal of Plant Sciences*, 10(07), 1121–1141. <https://doi.org/10.4236/AJPS.2019.107081>
- Ahloowalia, B. ., Prakash, J., & Savangikar, V. (2004). PLANT TISSUE CULTURE. In *Low cost options for tissue culture technology in developing countries* (Issue August 2002, pp. 26–30).
- Aicha, N., Mohamed, H., & Abdelmalek, E. L. M. (2014). In Vitro Clonal Propagation Through Direct Shoot Organogenesis of *Thymus Broussonetii* – a Vulnerable Aromatic and Medicinal. *International Journal of Pharmaceutical Research and Bio-Science*, 3(1), 425–439.
- Akdemir, H., Süzerer, V., Onay, A., Tilkat, E., Ersali, Y., & Çiftçi, Y. O. (2014). Micropropagation of the pistachio and its rootstocks by temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 117(1), 65–76. <https://doi.org/10.1007/s11240-013-0421-0>
- Akita, M., & Ohta, Y. (1998). A simple method for mass propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.) using a bioreactor without forced aeration. *Plant Cell Reports* 1998 18:3, 18(3), 284–287.

<https://doi.org/10.1007/S002990050572>

Albarrán, J., Bertrand, B., Lartaud, M., & Etienne, H. (2005). Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica*) somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2005 81:1, 81(1), 27–36.

<https://doi.org/10.1007/S11240-004-2618-8>

AlKhateeb, A., & Alturki, S. (2014). A comparison of liquid and semi-solid cultures on shoot multiplication and rooting of three date palm cultivars (*Phoenix dactylifera* L.) in vitro. *Advances in Environmental Biology*, 8(16), 263–269.

Aragón, C. E., Escalona, M., Rodriguez, R., Cañal, M. J., Capote, I., Pina, D., & González-Olmedo, J. (2010). Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 2009 46:1, 46(1), 89–94.

<https://doi.org/10.1007/S11627-009-9246-2>

Arencibia, A. D., Vergara, C., Quiroz, K., Carrasco, B., Bravo, C., Garcia-Gonzales, R., Arencibia, A. D., Vergara, C., Quiroz, K., Carrasco, B., Bravo, C., & Garcia-Gonzales, R. (2013). An Approach for Micropropagation of Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) Plants Mediated by Temporary Immersion Bioreactors (TIBs). *American Journal of Plant Sciences*, 4(5), 1022–1028.

<https://doi.org/10.4236/AJPS.2013.45126>

Bello-Bello, J. J., Canto-Flick, A., Balam-Uc, E., Gómez-Uc, E., Robert, M. L., Iglesias-Andreu, L. G., & Santana-Buzzy, N. (2010). Improvement of In Vitro Proliferation and Elongation of Habanero Pepper Shoots (*Capsicum chinense* Jacq.) by Temporary Immersion. *HortScience*, 45(7), 1093–1098.

<https://doi.org/10.21273/HORTSCI.45.7.1093>

Beyl, C. (2004). Getting Started with Tissue Culture: Media Preparation, Sterile Technique, and

- Laboratory Equipment. In R. N. Trigiano & D. J. Gray (Eds.), *Plant Development and Biotechnology* (pp. 19–25). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203506561>
- Bhatia, S. (2015). Plant Tissue Culture. In *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences* (pp. 31–107). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802221-4.00002-9>
- Bhojwani, S. S., & Dantu, P. K. (2013). Plant tissue culture: An introductory text. In *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9>
- Bidabadi, S. S., & Mohan Jain, S. (2020). Cellular, Molecular, and Physiological Aspects of In Vitro Plant Regeneration. *Plants 2020, Vol. 9, Page 702, 9(6)*, 702. <https://doi.org/10.3390/PLANTS9060702>
- Blaker, K. M., & Olmstead, J. W. (2014). Stone cell frequency and cell area variation of crisp and standard texture southern highbush blueberry fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *139(5)*, 553–557. <https://doi.org/10.21273/jashs.139.5.553>
- Brenes, A., Matamoros Castillo, R., & Gómez-alpízar, L. (2015). Micropropagación de cuatro cultivares de arándanos (*Vaccinium* spp.) a partir de segmentos nodales de dos procedencias. *Agronomía Costarricense*, *39(1)*, 7–23. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1097966>
- Bustillo, A. (2018). *El cultivo de arándano (Vaccinium corymbosum) y su Proyección en Colombia* [Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (UDCA)]. <https://repository.udca.edu.co/handle/11158/940>
- Callwood, J., Melmaiee, K., Kulkarni, K. P., Vennapusa, A. R., Aicha, D., Moore, M., Vorsa, N., Natarajan, P., Reddy, U. K., & Elavarthi, S. (2021). Differential morpho-physiological and transcriptomic responses to heat stress in two blueberry species. *International Journal of Molecular Sciences*, *22(5)*, 1–23. <https://doi.org/10.3390/ijms22052481>
- Cappai, F., Benevenuto, J., Ferrão, L. F. V., & Munoz, P. (2018). Molecular and Genetic Bases of Fruit

Firmness Variation in Blueberry—A Review. *Agronomy* 2018, Vol. 8, Page 174, 8(9), 174.

<https://doi.org/10.3390/AGRONOMY8090174>

Cappai, F., Garcia, A., Cullen, R., Davis, M., & Munoz, P. R. (2020). Advancements in Low-Chill Blueberry *Vaccinium corymbosum* L. Tissue Culture Practices. *Plants*, 9(11), 1–18.

<https://doi.org/10.3390/PLANTS9111624>

Cárdenas, M. (2019). Los beneficios del arándano, una fruta que toma fuerza en Ecuador. *Revista Metro*, 7–8. <https://www.metroecuador.com.ec/ec/empresarial/2019/05/15/los-beneficios-del-arandano-una-fruta-que-toma-fuerza-en-ecuador.html>

Castillo, A., Ashfield, R., Bentancor, M., Bentancor, L., Bonilla, M. B., & Ceppa, M. (2019).

Micropropagación De Plantas En Biorreactores De Inmersión Temporal (Bit). *Revista INIA*, 56, 88–91.

Chacha, J. (2020). *Evaluación de la respuesta del mortifio (Vaccinium floribundum Kunth) a la multiplicación en medios líquidos mediante la aplicación de sistemas de inmersión temporal*. Universidad de las Americas.

Chicaiza, A. (2021). *Organogénesis directa en arándano (Vaccinium Corymbosum L.) Revision de Literatura*. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano.

Clapa, D., Hârța, M., & Orsolya, B. (2019). Micropropagation of *Vaccinium Corymbosum* L. and *Corylus Avellana* L. Using a Temporary Immersion Bioreactor System. *Agricultura*, 111(4), 101–108.

<https://doi.org/10.15835/agrisp.v110i3-4.13545>

Cline, M. G. (1991). Apical dominance. *The Botanical Review*, 57(4), 318–358.

<https://doi.org/10.1007/BF02858771>

Cuello, J. L., & Yue, L. C. (2008). Ebb-and-Flow Bioreactor Regime and Electrical Elicitation: Novel

- Strategies for Hairy Root Biochemical Production. *Electronic Journal of Integrative Biosciences*, 3(1), 45–56.
- Curtis, W. R., & Tuerk, A. L. (2008). Oxygen Transport In Plant Tissue Culture Systems. *Plan Tissue Culture Engineering*, 173–186. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3694-1_10
- Debnath, S. (2008). Propagation of Vaccinium in Vitro: A review. *International Journal of Fruit Science*, 6(2), 47–71. https://doi.org/10.1300/J492v06n02_04
- Debnath, S. C. (2007). Strategies to propagate Vaccinium nuclear stocks for the Canadian berry industry. *Canadian Journal of Plant Science.*, 87(4), 911–922. <https://doi.org/10.4141/P06-131>
- Debnath, S. C. (2009). A Scale-up System for Lowbush Blueberry Micropropagation Using a Bioreactor. *HortScience*, 44(7), 1962–1966. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.44.7.1962>
- Debnath, S. C. (2011). Bioreactors and molecular analysis in berry crop micropropagation - A review. *Canadian Journal of Plant Science*, 91(1), 147–157.
<https://doi.org/10.4141/CJPS10131/ASSET/IMAGES/LARGE/CJPS10131F3.JPEG>
- Debnath, S. C. (2017). Temporary immersion and stationary bioreactors for mass propagation of true-to-type highbush, half-high, and hybrid blueberries (*Vaccinium* spp.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 92(1), 72–80. <https://doi.org/10.1080/14620316.2016.1224606>
- Debnath, S. C., & Arigundam, U. (2020). In vitro propagation strategies of medicinally important berry crop, lingonberry (*vaccinium vitis-idaea* l.). *Agronomy*, 10(5), 1–19.
<https://doi.org/10.3390/agronomy10050744>
- Debnath, S. C., & Goyali, J. C. (2020). In Vitro Propagation and Variation of Antioxidant Properties in Micropropagated Vaccinium Berry Plants—A Review. *Molecules*, 25(4).
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES25040788>

- Debnath, S. C., & Mcrae, K. B. (2010). *In Vitro Culture of Lingonberry (Vaccinium vitis-idaea L.) The Influence of Cytokinins and Media Types on Propagation*. https://doi.org/10.1300/J301v01n03_02
- Debnath, S. C., & McRae, K. B. (2001). An efficient in vitro shoot propagation of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) By axillary bud proliferation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 37(2), 243–249. <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0043-9>
- Del Bo', C., Riso, P., Campolo, J., Møller, P., Loft, S., Klimis-Zacas, D., Brambilla, A., Rizzolo, A., & Porrini, M. (2013). A single portion of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L) improves protection against DNA damage but not vascular function in healthy male volunteers. *Nutrition Research*, 33(3), 220–227. <https://doi.org/10.1016/J.NUTRES.2012.12.009>
- Desjardins, Y., Hdider, C., & De Riek, J. (1995). Carbon nutrition in vitro - regulation and manipulation of carbon assimilation in micropropagated systems. In Kluwer Academic Publishers (Ed.), *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture* (pp. 441–471).
- Dewanti, P., Widuri, L. I., Alfian, F. N., Addy, H. S., Okviandari, P., & Sugiharto, B. (2016). Rapid Propagation of Virus-free Sugarcane (*Saccharum officinarum*) by Somatic Embryogenesis. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 9, 456–461. <https://doi.org/10.1016/J.AASPRO.2016.02.163>
- Dierck, R., De Keyser, E., De Riek, J., Dhooghe, E., Van Huylenbroeck, J., Prinsen, E., & Van Der Straeten, D. (2016). Change in Auxin and Cytokinin Levels Coincides with Altered Expression of Branching Genes during Axillary Bud Outgrowth in Chrysanthemum. *PLOS ONE*, 11(8), e0161732. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0161732>
- Diktaş, N., Bozlar, T., & Daşdemir, İ. (2021). The Economic Analysis of Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) Cultivation in Eastern Black Sea Region of Turkey. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*,

58(4), 1107–1114. <https://doi.org/10.21162/PAKJAS/21.9922>

Ducos, J. P., Labbe, G., Lambot, C., & Pétiard, V. (2007). Pilot scale process for the production of pre-germinated somatic embryos of selected robusta (*Coffea canephora*) clones. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 43(6), 652–659. <https://doi.org/10.1007/S11627-007-9075-0>

Ducos, J. P., Terrier, B., Courtois, D., & Pétiard, V. (2008). Improvement of plastic-based disposable bioreactors for plant science needs. *Phytochemistry Reviews*, 7(3), 607–613. <https://doi.org/10.1007/S11101-008-9089-1>

Dun, E. A., Ferguson, B. J., & Beveridge, C. A. (2006). Apical Dominance and Shoot Branching. Divergent Opinions or Divergent Mechanisms? *Plant Physiology*, 142(3), 812–819. <https://doi.org/10.1104/PP.106.086868>

Eibl, R., & Eibl, D. (2008). Design of bioreactors suitable for plant cell and tissue cultures. *Phytochemistry Reviews*, 7(3), 593–598. <https://doi.org/10.1007/S11101-007-9083-Z>

Etienne, H., & Berthouly, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3), 215–231. <https://doi.org/10.1023/A:1015668610465>

Fowler, M. (2000). Plant cell culture, Laboratory Techniques. In *Encyclopedia of cell technology* (Vol. 1, pp. 994–1004). https://opac.library.osaka-u.ac.jp/opac/opac_link/bibid/3001043210

Gaba, V. (2005). Plant Growth Regulators in Plant Tissue Culture and Development. In *Plant Development and Biotechnology* (pp. 87–99). <https://doi.org/10.5860/choice.42-4023>

Galarza, J. M. (2019). *Estudio de factibilidad para la creación de la empresa “Arandeanblue”, productora y comercializadora de arándano, ubicada en el sector de Chaquibamba, provincia de Pichincha* [Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE].

<http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/16067/1/T-ESPE-038590.pdf>

- García, J. C., García, G., & Ciordia, M. (2013). Situación actual del cultivo del arándano en el mundo. *Tecnología Agroalimentaria. Boletín Informativo Del SERIDA*, 12, 5–8.
<http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4454466&orden=419260&info=link>
- García, R., Quiroz, K., Carrasco, B., & Caligari, P. (2010). Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges. *Ciencia e Investigacion Agraria*, 37(3), 5–30.
<https://doi.org/10.4067/S0718-16202010000300001>
- Gaspar, T., Keveks, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D. M., & Thorpe, T. A. (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 32(4), 272–289. <https://doi.org/10.1007/BF02822700>
- George, E., & Hall, M. (2008). Micropropagation: Uses and Methods. In *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition* (Vol. 1, pp. 29–64). <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3>
- George, E., Hall, M., & De Klerk, G. (2008). *Plant Propagation by tissue culture*.
- Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A., & Bley, T. (2014). Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in Life Sciences*, 14(6), 607–621.
<https://doi.org/10.1002/ELSC.201300166>
- González, P. (2018). El arándano, un fruto de reciente producción en el país. *Revista Líderes*, 6–7.
<https://www.revistalideres.ec/lideres/arandano-fruto-reciente-produccion-ecuador.html>
- González, P. (2018). El arándano, un fruto de reciente producción en el país. *Revista Líderes*, 8–10.
<https://www.revistalideres.ec/lideres/arandano-fruto-reciente-produccion-ecuador.html>
- Gough, R. (1994). *The highbush Blueberry and Its Management*.
- Goyes, J., & Rojas, Y. (2021). *ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA PROPAGACIÓN IN VITRO*

DE Vaccinium corymbosum (ARÁNDANO AZUL) EMPLEANDO LA TÉCNICA DE INMERSIÓN TEMPORAL EN BIORREACTORES EN EL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES LEPLANT DE LA CIUDAD DE AMBATO [ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO].

<http://dspace.esoch.edu.ec/bitstream/123456789/14791/1/236T0553.pdf>

Guo, Y. X., Zhao, Y. Y., Zhang, M., & Zhang, L. Y. (2019). Development of a novel in vitro rooting culture system for the micropropagation of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*) seedlings. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 139(3), 615–620. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01702-7>

Gupta, N., Jain, V., Joseph, M. R., & Devi, S. (2020). A Review on Micropropagation Culture Method. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 8(1), 86–93.

<https://doi.org/10.22270/ajprd.v8i1.653>

Hirvi, T., & Honkanen, E. (1983). The aroma of some hybrids between high-bush blueberry (*Vaccinium corymbosum*, L.) and Bog Blueberry (*Vaccinium uliginosum*, L.). *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung*, 176(5), 346–349. <https://doi.org/10.1007/BF01057724>

Hoy, J. W., Bischoff, K. P., Milligan, S. B., & Gravois, K. A. (2003). Effect of tissue culture explant source on sugarcane yield components. *Euphytica*, 129(2), 237–240.

<https://doi.org/10.1023/A:1021928823445>

Hussain, A., Ahmed, I., Nazir, H., & Ullah, I. (2012). Plant tissue culture: Current Status and Opportunities. In *Recent advances in plant in vitro culture* (pp. 1–28).

<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/50568>

Ibrahim, I. A., Nasr, M. I., Mohammed, B. R., & El-Zefzafi, M. M. (2008). Plant growth regulators affecting in vitro cultivation of *Stevia rebaudiana*. *Sugar Tech*, 10(3), 254–259.

<https://doi.org/10.1007/S12355-008-0045-6>

- Kaçar, Y., Biçen, B., Varol, İ., Mendi, Y., Serçe, S., & Çetiner, S. (2010). Gelling agents and culture vessels affect in vitro multiplication of banana plantlets. *Genetics and Molecular Research*, *9*(1), 416–424. www.funpecrp.com.br
- Kalt, W. (2006). Vaccinium berry crops and human health. *Acta Horticulturae*, *715*, 533–537. <https://doi.org/10.17660/ACTAHORTIC.2006.715.82>
- Kämäräinen-Karppinen, T., Virtanen, E., Rokka, V. M., & Pirttilä, A. M. (2010). Novel bioreactor technology for mass propagation of potato microtubers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *101*(2), 245–249. <https://doi.org/10.1007/S11240-010-9679-7>
- Kole, C. (2011). Wild crop relatives: Genomic and breeding resources: Temperate fruits. *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Temperate Fruits*, 1–247. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-16057-8>
- Kumar, N., & Reddy, M. P. (2011). In vitro Plant Propagation: A Review. *Journal of Forest Science*, *27*(2), 61–72. <http://www.koreascience.or.kr/article/JAKO201122350102027.pdf>
- Kunakhonnuruk, B. (2018). DEVELOPMENT OF MODIFIED TEMPORARY IMMERSION TECHNOLOGY FOR MASS PROPAGATION OF SOME VALUABLE PLANTS. In *Graduate School of Naresuan University*. Naresuan University.
- Leifen, C., Murphy, K. P., & Lumsden, P. J. (1995). Mineral and Carbohydrate Nutrition of Plant Cell and Tissue Cultures. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *14*(2), 83–109. <https://doi.org/10.1080/07352689509701923>
- Lim, T. K. (2012). Edible medicinal and non-medicinal plants: Volume 2, fruits. *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants: Volume 2, Fruits*, 1–1088. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-1764-0>
- Lim, T. K. (2016). Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants. In *Edible Medicinal and Non-Medicinal*

- Plants* (Vol. 10). <https://doi.org/10.1007/978-94-017-7276-1>
- Litwińczuk, W. (2012). Micropropagation of sp. by In Vitro Axillary Shoot Proliferation. In *Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants* (pp. 63–76). Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-074-8_5
- Lyam, P. T., Musa, M. L., Jamaledine, Z. O., Okere, U. A., & Odofoin, W. T. (2012). The Potential of Temporary Immersion Bioreactors (TIBs) in Meeting Crop Production Demand in Nigeria. *Journal of Biology and Life Science*, 3(1), 66–86. <https://doi.org/10.5296/jbls.v3i1.1156>
- Mackintosh, A. (2021). Blueberries and strawberries in battle for Australia's most valuable berry crop. *ABC NEWS*. <https://www.abc.net.au/news/rural/2021-09-27/blueberry-vs-strawberry-australias-most-valuable-berry-crop/100493978>
- Mehrotra, S., Mishra, S., & Srivastava, V. (2018). Bioreactor Technology for Hairy Roots Cultivation. In A. Pavlov & T. Bley (Eds.), *Bioprocessing of Plant In Vitro Systems* (pp. 483–506). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-54600-1>
- Meléndez, M. R., Flor, L. E., Sandoval, M. E., Vasquez, W. A., & Racines Oliva, M. A. (2021). *Vaccinium* spp.: Karyotypic and phylogenetic characteristics, nutritional composition, edaphoclimatic conditions, biotic factors and beneficial microorganisms in the rhizosphere. *Scientia Agropecuaria*, 12(1), 109–120. <https://doi.org/10.17268/SCI.AGROPECU.2021.013>
- Mendonça, E., Stein, V., De Carvalho, H., Santos, B., Beijo, L., & Paiva, L. (2016). THE USE OF CONTINUOUS, TEMPORARY IMMERSION BIOREACTOR SYSTEM AND SEMISOLID CULTURE MEDIUM FOR THE PRODUCTION OF *Eucalyptus camaldulensis* CLONES. *Ciência Florestal*, 26(4), 1211–1224. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53449110016>
- Meneses, L. S., Morillo, L. E., & Vásquez-Castillo, W. (2022). In vitro propagation of *Vaccinium*

floribundum Kunth from seeds: promissory technology for mortiño accelerated production.

<https://doi.org/10.1139/CJPS-2020-0290>, 102(1), 216–224. <https://doi.org/10.1139/CJPS-2020-0290>

Miller, S., Rawnsley, E., George, J., & Patel, N. (2006). A comparison of blueberry propagation techniques used in New Zealand. *Acta Horticulturae*, 715, 397–401.

<https://doi.org/10.17660/actahortic.2006.715.59>

Molnár, Z., Virág, E., & Ördög, V. (2011). View of Natural substances in tissue culture media of higher plants. *Acta Biologica Szegediensis*, 55(123–127). [http://abs.bibl.u-](http://abs.bibl.u-szeged.hu/index.php/abs/article/view/2731/2723)

[szeged.hu/index.php/abs/article/view/2731/2723](http://abs.bibl.u-szeged.hu/index.php/abs/article/view/2731/2723)

Monja-Mio, K. M., Olvera-Casanova, D., Herrera-Alamillo, M., Sánchez-Teyer, F. L., & Robert, M. L.

(2021). Comparison of conventional and temporary immersion systems on micropropagation (multiplication phase) of *Agave angustifolia* Haw. 'Bacanora.' *3 Biotech 2021 11:2*, 11(2), 1–8.

<https://doi.org/10.1007/S13205-020-02604-8>

Mora, H. (2010). *Organogeneis in vitro de arándano Vaccinium corymbosum L.* [Instituto Politécnico

Nacional]. [https://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/8007/1/Hugo Victoriano Mora -Mar2010.pdf](https://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/8007/1/Hugo%20Victoriano%20Mora%20-%20Mar2010.pdf)

Mordocco, A. M., Brumbley, J. A., & Lakshmanan, P. (2009). Development of a temporary immersion system (RITA®) for mass production of sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids). *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 45(4), 450–457. [https://doi.org/10.1007/s11627-008-](https://doi.org/10.1007/s11627-008-9173-7)

[9173-7](https://doi.org/10.1007/s11627-008-9173-7)

Muñoz, C., Lobos, W., & Guerrero, J. (1988). Arándano: Antecedentes Generales. In *El cultivo del arándano* (pp. 13–25).

- Nadulski, R., Masłowski, A., Mazurek, A., Sobczak, P., Szmigielski, M., Żukiewicz-Sobczak, W., Niedziółka, I., & Mazur, J. (2019). Vitamin C and lutein content of northern highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) juice processed using freezing and thawing. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *13*(4), 2521–2528. <https://doi.org/10.1007/S11694-019-00172-X/TABLES/3>
- Navarro, G., Sequeira, A., Castro, A., Tapia, E., Prieto, H., & Zamora, P. (2013). *Thermo-photo-bioreactor and method for the culture and mass micropropagation of deschampsia antarctica in vitro* (Patent No. EP2638798A1). <https://patentimages.storage.googleapis.com/2c/6c/10/feeb554c53cadf/EP2638798A1.pdf>
- Ormazábal, Y. M., Mena, C. A., Cantillana, J. C., & Lobos, G. E. (2020). Characterization of farm fields of Blueberry (*Vaccinium corymbosum*) according to technological level. The case of the Maule region, Chile. *Informacion Tecnologica*, *31*(1), 41–52. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642020000100041>
- Orsolya, B., Harta, M., Pamfil, D., & Clapa, D. (2019). The Effect Of Cytokinins On Micropropagation Success Of Highbush Blueberry (*Vaccinium Corymbosum* L.). *Agricultura*, *111*(3–4), 93–100. <https://doi.org/10.15835/agrisp.v111i3-4.13546>
- Ostrolucká, M., Gajdošová, A., Libiaková, G., Hrubíková, K., & Bežo, M. (2007). Protocol for micropropagation of selected *vaccinium* spp. *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*, 445–455. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6352-7_41/COVER/
- Ostrolucká, Mária, Gajdošová, A., Ondrušková, E., & Libiaková, G. (2010). IN VITRO PROPAGATION OF SEVERAL VACCINIUM CORYMBOSUM L. AND VACCINIUM VITIS-IDAEA L. CULTIVARS VAIRĀKU VACCINIUM CORYMBOSUM L. *Latvian Journal of Agronomy*, *12*, 75–80.
- Paek, K. Y., Chakrabarty, D., & Hahn, E. J. (2005). Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *81*(3), 287–

300. <https://doi.org/10.1007/S11240-004-6648-Z>

- Prakash, S., Hoque, M., & Brinks, T. (2012). CULTURE MEDIA AND CONTAINERS. In *Recent advances in plant in vitro culture* (pp. 29–37).
- Prodorutti, D., Pertot, I., Giongo, L., & Gessler, C. (2007). Highbush blueberry: cultivation, protection, breeding and biotechnology. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*, 1(1), 44–56.
- Quiala, E., Cañal, M. J., Meijón, M., Rodríguez, R., Chávez, M., Valledor, L., de Feria, M., & Barbón, R. (2011). Morphological and physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BA treatments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 2011 109:2*, 109(2), 223–234. <https://doi.org/10.1007/S11240-011-0088-3>
- Rashidinejad, A. (2020). Blueberries. *Nutritional Composition and Antioxidant Properties of Fruits and Vegetables*, 467–482. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812780-3.00029-5>
- Reis, R. V., Borges, A. P. P. L., Chierrito, T. P. C., de Souto, E. R., de Souza, L. M., Iacomini, M., de Oliveira, A. J. B., & Gonçalves, R. A. C. (2011). Establishment of adventitious root culture of *Stevia rebaudiana* Bertoni in a roller bottle system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 2011 106:2*, 106(2), 329–335. <https://doi.org/10.1007/S11240-011-9925-7>
- Robert, M. L., Herrera-Herrera, J. L., Herrera-Herrera, G., Herrera-Alamillo, M. A., & Fuentes-Carrillo, P. (2006). A new temporary immersion bioreactor system for micropropagation. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 318, 121–129. <https://doi.org/10.1385/1-59259-959-1:121/COVER/>
- Rodrigues, P. H. V., Teixeira, F. M., Lima, A. M. L. P., & Ambrosano, G. M. B. (2006). Propagação de mudas de helicônia em biorreator de imersão temporária. *Bragantia*, 65(1), 29–35. <https://doi.org/10.1590/S0006-87052006000100005>

- Rodriguez-Saona, C., Vincent, C., & Isaacs, R. (2019). Blueberry IPM: Past successes and future challenges. *Annual Review of Entomology*, *64*, 95–114. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011118-112147>
- Rodríguez, M., & Morales, D. (2015). Effect of explant density and volume of cultivation medium on in vitro multiplication of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) varieties “Brigitta” and “Legacy.” *Scientia Agropecuaria*, *6*(1), 31–40. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2015.01.03>
- Rojas, L., Visser, R., & de Klerk, G. (2010). The hyperhydricity syndrome: Waterlogging of plant tissues as a major cause. *Propagation of Ornamental Plants*, *10*(4), 169–175.
- Ross, S., & Castillo, A. (2009). Propagación masal de *Vaccinium corymbosum* en bioreactores. *Agrociencia Uruguay*, 48–68. http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2301-15482009000200001
- Ružić, D., Vujović, T., Libiakova, G., Cerović, R., & Gajdošova, A. (2012). Micropropagation in vitro of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of Berry Research*, *2*(2), 97–103. <https://doi.org/10.3233/JBR-2012-030>
- Saher, S., Piqueras, A., Hellin, E., & Olmos, E. (2004). Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: The role of oxidative stress. *Physiologia Plantarum*, *120*(1), 152–161. <https://doi.org/10.1111/J.0031-9317.2004.0219.X>
- Samad, N. B., Debnath, T., Ye, M., Hasnat, M. A., & Lim, B. O. (2014). In vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of Korean blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *4*(10), 807–815. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C1008>
- San Martín, J. (2013). Situación varietal en arándano. *Manual de Arándano. Boletín INIA*, 15–21.
- Scalzo, J., Donno, D., Miller, S., Ghezzi, M., Mellano, M. G., Cerutti, A. K., & Beccaro, G. L. (2016). Effect

of genotype, medium and light on in vitro plant proliferation of *Vaccinium* spp. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 44(4), 231–246.

https://doi.org/10.1080/01140671.2016.1206946/SUPPL_FILE/TNZC_A_1206946_SM0877.DOCX

Scheidt, G. N., Arakaki, A. H., Chimilovski, J. S., Portella, A. C. F., Spier, M. R., Woiciechowski, A. L., Biasi, L. A., & Soccol, C. R. (2009). Utilization of the biorreactor of imersion by bubbles at the micropropagation of *Ananas comosus* L. Merril. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(SPL.ISS.), 37–43. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132009000700005>

Scheidt, G. N., Luís, A., Dronk, A. G., Biasi, L. A., & Soccol, C. R. (2009). Multiplicação in vitro de *Oncidium leucochilum* (Orchidaceae) em diferentes sistemas de cultivo. *BIOCIÊNCIAS*, 17(1), 82–85.

Scherer, R. F., Garcia, A. C., Fraga, H. P. de F., Vesco, L. L. D., Steinmacher, D. A., & Guerra, M. P. (2013). Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*). *Scientia Horticulturae*, 151, 38–45. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2012.11.027>

Sedlak, J., & Paprstein, F. (2009). In vitro multiplication of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivars. *Acta Horticulturae*, 810, 575–580. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.810.76>

Sequeira, Á., Tapia, · Eduardo, Ortega, M., Zamora, P., Castro, Á., Montes, C., Zúñiga, G. E., & Prieto, H. (2012). *Electronic Journal of Biotechnology Production of phenolic metabolites by Deschampsia antarctica* shoots using UV-B treatments during cultivation in a photobioreactor. <https://doi.org/10.2225/vol15-issue4-fulltext-7>

Shi, X., Yang, L., Yan, G., & Du, G. (2017). Medium pH between 5.5 and 7.5 has Minimal Effects on Tissue Culture of Apple. *HortScience*, 52(3), 475–478. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI11443-16>

Smrke, T., Veberic, R., Hudina, M., Zitko, V., Ferlan, M., & Jakopic, J. (2021). Fruit quality and yield of

three highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivars grown in two planting systems under different protected environments. *Horticulturae*, 7(12).

<https://doi.org/10.3390/HORTICULTURAE7120591>

Steingroewer, J., Bley, T., Georgiev, V., Ivanov, I., Lenk, F., Marchev, A., & Pavlov, A. (2013).

Bioprocessing of differentiated plant in vitro systems. *Engineering in Life Sciences*, 13(1), 26–38.

<https://doi.org/10.1002/ELSC.201100226>

Steinmacher, D. A., Guerra, M. P., Saare-Surminski, K., & Lieberei, R. (2011). A temporary immersion

system improves in vitro regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis.

Annals of Botany, 108(8), 1463–1475. <https://doi.org/10.1093/AOB/MCR033>

Tanaka, M., Takei, K., Kojima, M., Sakakibara, H., & Mori, H. (2006). Auxin controls local cytokinin

biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *The Plant Journal*, 45(6), 1028–1036.

<https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2006.02656.X>

Teisson, C., & Alvard, D. (1995). A NEW CONCEPT OF PLANT IN VITRO CULTIVATION LIQUID MEDIUM :

TEMPORARY IMMERSION . In M. Terzi, R. Cella, & A. Falavigna (Eds.), *Current Issues in Plant*

Molecular and Cellular Biology (Vol. 22, pp. 105–110). Springer Netherlands.

<https://doi.org/10.1007/978-94-011-0307-7>

Trebilcock, P., Kuhn, M., & Pizarro, R. (2021). El arándano peruano sigue quebrando sus récords. *Revista*

Redagícola, 74, 26–28. [https://www.redagricola.com/pe/assets/uploads/2021/05/redagricola-](https://www.redagricola.com/pe/assets/uploads/2021/05/redagricola-peru-74.pdf)

[peru-74.pdf](https://www.redagricola.com/pe/assets/uploads/2021/05/redagricola-peru-74.pdf)

Uchendu, E. E., Paliyath, G., Brown, D. C. W., & Saxena, P. K. (2011). In vitro propagation of North

American ginseng (*Panax quinquefolius* L.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*,

47(6), 710–718. <https://doi.org/10.1007/S11627-011-9379-Y>

- Undugarraga, P., & Vargas, S. (2013). Manual de arándanos. *Boletín Instituto de Investigaciones Agropecuarias N°263, 263*, 1–120. <https://biblioteca.inia.cl/handle/123456789/7627>
- Uozumi, N. (2004). Large-scale production of hairy root. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 91*, 75–103. <https://doi.org/10.1007/B94206/COVER/>
- Valdiani, A., Hansen, O. K., Nielsen, U. B., Johannsen, V. K., Shariat, M., Georgiev, M. I., Omidvar, V., Ebrahimi, M., Tavakoli Dinanai, E., & Abiri, R. (2019). Bioreactor-based advances in plant tissue and cell culture: challenges and prospects. *Critical Reviews in Biotechnology, 39*(1), 20–34. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1489778>
- Vasconcelos, A., Ferreira, L., Rangel, T., & Willadino, L. (2012). Hyperhydricity: A metabolic disorder. *Ciencia Rural, 42*(5), 837–844. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782012000500013>
- Verdeil, J. L., Alemanno, L., Niemenak, N., & Tranbarger, T. J. (2007). Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? *Trends in Plant Science, 12*(6), 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.04.002>
- Watt, P. (2012). The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. *African Journal of Biotechnology, 11*(76), 14025–14035. <https://doi.org/10.5897/ajb12.1693>
- Williams, R. R. (1995). The chemical microenvironment. In *Automation and environmental control in plant tissue culture* (Issue 1962, pp. 406–439).
- Xie, X., Yoneyama, K., & Yoneyama, K. (2010). The strigolactone story. *Annual Review of Phytopathology, 48*, 93–117. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHYTO-073009-114453>
- Xu, Z. H., Zhang, X. S., Su, Y. H., & Hu, Y. (2019). Plant cell totipotency and regeneration. *Scientia Sinica Vitae, 49*(10), 1282–1300. <https://doi.org/10.1360/SSV-2019-0199>

- Yang, J. F., Piao, X. C., Sun, D., & Lian, M. L. (2010). Production of protocorm-like bodies with bioreactor and regeneration in vitro of *Oncidium* "Sugar Sweet." *Scientia Horticulturae*, 125(4), 712–717.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.05.003>
- Yang, L., Zambrano, Y., Hu, C. J., Carmona, E. R., Bernal, A., Pérez, A., Zayas, C. M., Li, Y. R., Guerra, A., Santana, I., & Arencibia, A. D. (2010). Sugarcane metabolites produced in CO₂-rich temporary immersion bioreactors (TIBs) induce tomato (*Solanum lycopersicum*) resistance against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 46(6), 558–568.
<https://doi.org/10.1007/S11627-010-9312-9/FIGURES/5>
- Yaseen, M., Ahmad, T., Sablok, G., Standardi, A., & Hafiz, I. A. (2013). Review: Role of carbon sources for in vitro plant growth and development. *Molecular Biology Reports*, 40(4), 2837–2849.
<https://doi.org/10.1007/S11033-012-2299-Z>
- Zhou, Y. (2015). Cultivated and Wild Highbush Blueberry Composition and Influence of Brown Marmorated Stink Bug Infestation on Its Anthocyanin and Phenolics Accumulation [The Ohio State University]. In *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* (Vol. 35, Issue 1).
https://etd.ohiolink.edu/!etd.send_file?accession=osu1437665403&disposition=inline