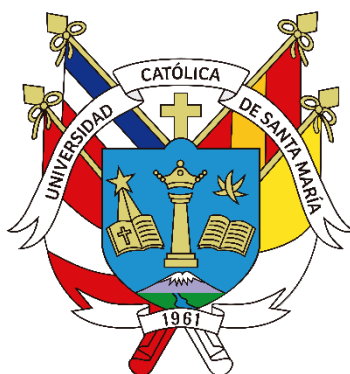


Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotechnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotechnológica



**Desarrollo de un protocolo para establecimiento, multiplicación en
biorreactor de inmersión temporal (BIT) y enraizamiento *in vitro* de
Rubus idaeus (Frambuesa) variedad Heritage a partir de segmentos
nodales**

Tesis presentada por los Bachilleres:

Romero Iquiapaza, Jhuliann Nicolas
ORCID: 0009-0007-5332-901X

Salazar Ortiz, Laura Sofia
ORCID: 0009-0005-4495-2729

para optar el Título Profesional de Ingeniero Biotecnólogo

Asesora:

Mg. Córdova Barrios, Cinthia Cárol
ORCID: 0000-0002-9871-3134

Arequipa - Perú
2025

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

INGENIERIA BIOTECNOLOGICA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 13 de Diciembre del 2024

Dictamen: 009794-C-EPIB-2024

Visto el borrador del expediente 009794, presentado por:

2017224401 - ROMERO IQUIAPAZA JHULIANN NICOLAS

2017249062 - SALAZAR ORTIZ LAURA SOFIA

Titulado:

**DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA ESTABLECIMIENTO, MULTIPLICACIÓN EN
BIORREACTOR DE INMERSIÓN TEMPORAL (BIT) Y ENRAIZAMIENTO IN VITRO DE RUBUS
IDAEUS (FRAMBUESA) VARIEDAD HERITAGE A PARTIR DE SEGMENTOS NODALES**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

Título Profesional/Título de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

INGENIERO BIOTECNOLOGO

43679772 - LOPEZ ALVAREZ NATALIA PAOLA
DICTAMINADOR



47604629 - TEJADA MEZA KEVIN
DICTAMINADOR

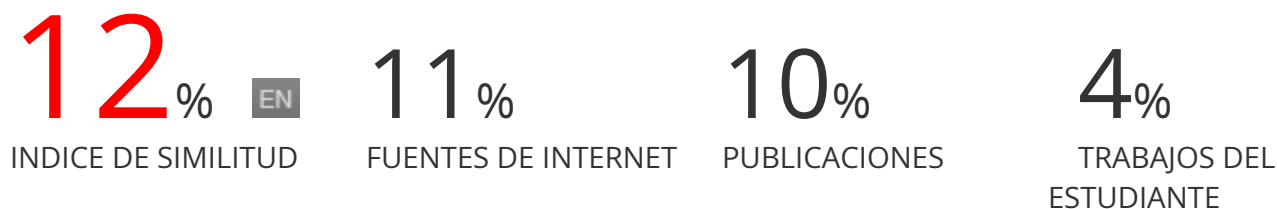


71093620 - JOHNSON CORRALES FABRIZIO
DICTAMINADOR



Desarrollo de un protocolo para establecimiento, multiplicación en biorreactor de inmersión temporal (BIT) y enraizamiento in vitro de *Rubus idaeus* (Frambuesa) variedad Heritage a partir de segmentos

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	link.springer.com Fuente de Internet	1%
2	journals.usamvcluj.ro Fuente de Internet	1%
3	hrcak.srce.hr Fuente de Internet	1%
4	pdffox.com Fuente de Internet	1%
5	dokumen.pub Fuente de Internet	<1%
6	www.mdpi.com Fuente de Internet	<1%
7	mdpi-res.com Fuente de Internet	<1%
8	eprints.usm.my Fuente de Internet	<1%

DEDICATORIA

A mis padres, Karely y Percy por su apoyo incondicional y a mi amada mamá Elita, mi ángel guardián.

Laura Sofia Salazar Ortiz

Dedico este trabajo a mis padres, especialmente a mi madre por su constante apoyo incondicional y a mi hermano Gabriel, con la esperanza de que esta tesis sea un recordatorio de que, con esfuerzo y perseverancia, todo es posible.

Jhuliann Nicolas Romero Iquiapaza

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestro más profundo agradecimiento a nuestros padres, por su amor incondicional y su apoyo constante, que hicieron posible nuestro desarrollo en la carrera y la realización de este trabajo. A nuestra familia por brindarnos apoyo y siempre estar dispuestos a escucharnos, y a aquellas personas, quien en vida estarían felices de ver este nuevo logro en nuestras vidas. Un agradecimiento a los integrantes de este trabajo, por comprometernos con este proyecto, alentarnos y apoyarnos mutuamente.

Quisiéramos agradecer a la Universidad Católica de Santa María y a la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, por brindarnos la oportunidad de crecer académicamente y abrirnos sus puertas.

Un sincero agradecimiento a la Mag. Cinthia Cárol Córdova Barrios, por ayudarnos como nuestra asesora en este proyecto.

Finalmente, agradecemos al señor Marcos, por su amabilidad, consejos y por facilitarnos el material de laboratorio necesario para llevar a cabo la experimentación de este trabajo.

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se desarrolló un protocolo para establecer, multiplicar utilizando un biorreactor de inmersión temporal y enraizar *in vitro* *Rubus idaeus* (frambuesa) variedad Heritage. Se probaron 4 métodos de desinfección de segmentos nodales como explantes utilizando alcohol al 70% más hipoclorito de sodio (NaClO) al 2.5%, donde se compararon los tiempos de exposición, 10 y 15 minutos, con la adición y omisión de Tween 20 al 0.1%. Se diseñó y construyó un biorreactor de inmersión temporal basado en el modelo SETIS™ para la multiplicación de los brotes, se evaluaron los tiempos (3, 4 y 5 minutos) y frecuencias (2, 3 y 4 veces al día) de inmersión en un medio MS suplementado con 1mg/L de BAP y 0.5mg/L de GA₃ con 30g/L de sacarosa. Luego, se analizaron diferentes concentraciones de las auxinas AIA (1.0 y 1.5 mg/L), IBA (0.2, 0.5 y 1.0 mg/L) y ANA (0.5, 1.0 y 1.5 mg/L) en un medio MS, cuya concentración fue reducida a la mitad (½ MS) para el enraizamiento de los brotes. Además, se evaluó el efecto de la reducción de la concentración de la sacarosa a 15 g/L en la fase de multiplicación, tanto *in vitro* como en biorreactor y en todos los tratamientos de enraizamiento. Finalmente, se evaluó la eficiencia de cultivo *in vitro* frente a biorreactor para la multiplicación de *Rubus idaeus*.

El mejor tratamiento de desinfección fue un lavado en alcohol 70% por 2 minutos, seguido de NaClO al 2.5% con Tween 20 al 0.1% durante 15 minutos; obteniendo un 60% de viabilidad, 20% de oxidación y 20% de contaminación. Se determinó que 4 minutos de inmersión 3 veces al día fue la configuración óptima para multiplicar los brotes, logrando un coeficiente de multiplicación de 3.6 y una longitud media de 1.06 cm, sin embargo, no hubo diferencia significativa entre las configuraciones. Se logró un 100% de enraizamiento y 4 raíces por brote de 3.19 cm utilizando 0.5 mg/L de ANA, donde todos los tratamientos tuvieron diferencia estadísticamente significativa. En concentraciones mayores a 0.2 mg/L de IBA y mayores a 0.5 mg/L de ANA se desarrollaron callos basales en los brotes. La reducción de la sacarosa no tuvo efecto significativo en la multiplicación *in vitro*. Sin embargo, si hubo efecto al emplear biorreactor, ya que aumentó considerablemente el coeficiente de multiplicación llegando a 5.8. En cuanto al enraizamiento, se observó que con 1 mg/L de AIA mejoró la formación de raíces hasta 4.2 por brote de 2.12 cm, mientras que, con 0.5 mg/L de ANA se desarrollaron callos basales. Por último, se determinó que el uso de biorreactor logró superar en coeficiente de multiplicación (5.8), altura (1.31 cm) y aspecto de los brotes frente al cultivo *in vitro*.

PALABRAS CLAVE: biorreactor, desinfección, enraizamiento, multiplicación, *Rubus idaeus*



ABSTRACT

In the present research work, a protocol was developed to establish, multiply using a temporary immersion bioreactor and root *in vitro* *Rubus idaeus* (raspberry) cultivar Heritage. Four disinfection methods of nodal segments as explants were tested using 70% alcohol plus 2.5% sodium hypochlorite (NaClO), where exposure times were compared, 10 and 15 minutes, with the addition and omission of 0.1% Tween 20. A temporary immersion bioreactor based on the SETIS™ model was designed and built for shoot multiplication, the immersion times (3, 4 and 5 minutes) and frequencies (2, 3 and 4 times a day) in MS media supplemented with 1 mg/L BAP and 0.5 mg/L GA₃ with 30 g/L sucrose were evaluated. Then, different concentrations of the auxins IAA (1.0 and 1.5 mg/L), IBA (0.2, 0.5 and 1.0 mg/L) and NAA (0.5, 1.0 and 1.5 mg/L) were tested in MS media, which concentration was reduced by half (1/2 MS), for shoot rooting. In addition, the effect of reducing the sucrose concentration to 15 g/L was evaluated in the multiplication phase, both *in vitro* and in a biorreactor, and in all rooting treatments. Finally, the efficiency of *in vitro* versus bioreactor culture for the multiplication of *Rubus idaeus* was evaluated.

The best disinfection treatment was a wash in 70% alcohol for 2 minutes, followed by 2.5% NaClO with 0.1% Tween 20 for 15 minutes; which 60% viability, 20% oxidation and 20% contamination was obtained. It was determined that 4 minutes of immersion 3 times a day was the optimal configuration to multiply the shoots, with a multiplication coefficient of 3.6 and an average length of 1.06 cm, however, there was no significant difference between the configurations. A 100% rooting and 4 roots per 3.19 cm shoot were achieved using 0.5 mg/L of ANA, where all treatments had statistically significant differences. At concentrations greater than 0.2 mg/L of IBA and greater than 0.5 mg/L of ANA, basal calluses developed on the shoots. The reduction of sucrose had no significant effect on *in vitro* multiplication. However, there was an effect when using a bioreactor, since it considerably increased the multiplication coefficient reaching 5.8. Regarding rooting, it was observed that with 1 mg/L of IBA, root formation improved up to 4.2 of 2.12 cm per shoot, while with 0.5 mg/L of ANA, basal calluses developed. Finally, it was determined that the use of a bioreactor managed to overcome the multiplication coefficient (5.8), height (1.31 cm) and appearance of the shoots compared to *in vitro* culture.

KEY WORDS: bioreactor, disinfection, rooting, multiplication, *Rubus idaeus*

ÍNDICE

DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTOS	
RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS	3
OBJETIVOS.....	4
OBJETIVO GENERAL.....	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
TABLA DE VARIABLES E INDICADORES	5
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	6
1. Generalidades de la Frambuesa	6
1.1. Taxonomía.....	6
1.2. Descripción botánica	6
1.3. Composición química y propiedades nutraceuticas	7
1.4. Variedades.....	8
1.4.1. Variedades remontantes.....	8
1.4.2. Variedades no remontantes.....	10
1.5. Condiciones de cultivo	11
1.6. Técnicas de propagación en campo.....	11
1.6.1. Técnica tradicional	12
1.6.2. Técnicas modernas	12
1.7. Importancia económica	12
2. Cultivo de tejido vegetal <i>in vitro</i>	13
2.1. Cultivo de órganos	13
2.2. Cultivo de células desorganizadas	14

2.3. Cultivos unicelulares	14
2.4. Micropropagación	14
2.4.2. Etapas de la micropropagación.....	15
2.5. Condiciones de cultivo <i>in vitro</i>	17
2.6. Medios de cultivo	18
2.6.1. Reguladores de crecimiento	19
2.7. Problemas frecuentes en la micropropagación.....	20
2.7.1. Planta madre, genotipo y explante.....	20
2.7.2. Recalcitrancia	21
2.7.3. Hiperhidricidad.....	21
2.7.4. Consistencia del medio.....	21
2.7.5. Contaminación.....	22
2.7.6. Oxidación/Fenolización.....	22
2.7.7. Variación somaclonal	23
3. Biorreactores en el cultivo <i>in vitro</i>	23
3.1. Tipos de biorreactores	24
3.1.1. Inmersión continua	24
3.1.2. Inmersión temporal.....	26
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	30
1. Materiales.....	30
2. Métodos	31
2.1. Lugar de ejecución	31
2.2. Establecimiento <i>in vitro</i>	31
2.2.1. Material vegetal	31
2.2.2. Evaluación de métodos de desinfección.....	32
2.3. Diseño y construcción de un biorreactor de inmersión temporal.....	34

2.4. Determinación de la frecuencia y tiempo de inmersión óptimos en un biorreactor para la multiplicación de <i>Rubus idaeus</i>	35
2.5. Evaluación del efecto de las auxinas en el enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Rubus idaeus</i>	36
2.6. Evaluación del efecto de la concentración de sacarosa en la micropropagación ..	36
2.6.1 Evaluación del efecto de la concentración de sacarosa en fase de multiplicación	36
2.6.2. Evaluación del efecto de la concentración de sacarosa en fase de enraizamiento	37
2.7. Comparación de la eficiencia de multiplicación <i>in vitro</i> frente al cultivo en biorreactor	39
3. Diagrama de flujo de actividades.....	39
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
1. Establecimiento <i>in vitro</i>	40
1.1. Evaluación de desinfección de explantes.....	40
2. Diseño y construcción de un biorreactor de inmersión temporal	44
2.1. Funcionamiento del biorreactor	46
3. Determinación de la frecuencia y tiempo de inmersión óptimos en un biorreactor para la multiplicación de <i>Rubus idaeus</i>	47
3.1. Evaluación de la longitud de los explantes desarrollados en biorreactor.....	48
3.2. Evaluación del número de brotes y coeficiente de multiplicación de los explantes desarrollados en biorreactor	50
4. Evaluación del efecto de las auxinas en el enraizamiento <i>in vitro</i> de <i>Rubus idaeus</i> ...	52
5. Evaluación del efecto de la concentración de sacarosa en la micropropagación.....	55
5.1. Evaluación del efecto de la concentración de la sacarosa en la fase de multiplicación	56
5.2. Evaluación del efecto de la concentración de la sacarosa en la fase de enraizamiento	57

6. Comparación de la eficiencia de la multiplicación <i>in vitro</i> frente al cultivo en biorreactor	59
CONCLUSIONES.....	62
RECOMENDACIONES	63
REFERENCIAS	64
ANEXOS.....	74



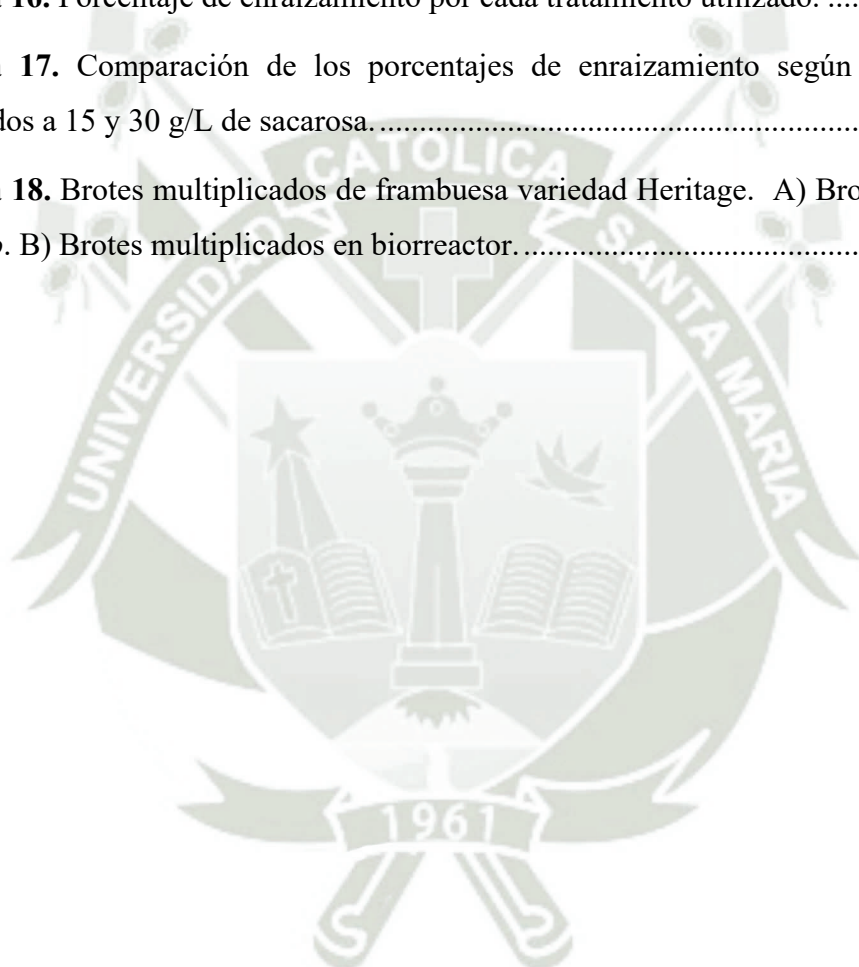
ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Variables e indicadores.....	5
Tabla 2. Composición del medio Murashige Skoog (MS) de 1962.	19
Tabla 3. Reguladores de crecimiento comúnmente usados en el cultivo vegetal <i>in vitro</i> ..	20
Tabla 4. Tratamientos de desinfección utilizados.....	33
Tabla 5. Tratamientos para la evaluación de tiempo y frecuencia de inmersión del biorreactor.....	35
Tabla 6. Tratamientos para la evaluación de concentración de auxinas.....	36
Tabla 7. Tratamientos de concentración de sacarosa para multiplicación de brotes.....	37
Tabla 8. Tratamientos de concentración de sacarosa para enraizamiento <i>in vitro</i>	38
Tabla 9. Comparación de la eficiencia de multiplicación <i>in vitro</i> vs biorreactor.....	39
Tabla 10. Porcentaje de segmentos nodales de frambuesa no contaminados y contaminados tras 4 semanas de los tratamientos de desinfección.....	40
Tabla 11. Media de alturas de brotes de cada configuración de frecuencia y tiempo de inmersión.....	48
Tabla 12. Coeficiente de multiplicación de número de brotes de cada configuración de frecuencia y tiempo de inmersión.....	50
Tabla 13. Media de longitud y número de raíces desarrollados por cada tratamiento de enraizamiento.	53
Tabla 14. Alturas de brotes y Coeficientes de Multiplicación (CM) alcanzados según tratamientos de concentración de sacarosa.....	56
Tabla 15. Número de raíces y longitud media según la concentración de sacarosa y auxina utilizada en el medio de enraizamiento.	58
Tabla 16. Longitud de brotes y CM de frambuesa variedad Heritage multiplicadas <i>in vitro</i> y en biorreactor.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelos de biorreactores de inmersión temporal: A) RITA [®] . B) Twin-flask. C) PLANTFORM [™] . D) MATIS [®] . E) RALM. F) SETIS [™] . G) PLANTIMA [®] . H) Biorreactor de flujo y reflujo. I) Biorreactor de inmersión por burbujas (BIB). J) BioCoupler [™] . K) BioMINT [™] .	29
Figura 2. Material vegetal. A) Planta madre de <i>Rubus idaeus</i> (frambuesa). B) Plantas <i>in vitro</i> de frambuesa.	32
Figura 3. Pre-tratamiento del material vegetal. A) Transporte del material vegetal. B) Explantes seleccionados. C) Poda de hojas de los explantes. D) Lavado en agua jabonosa.	32
Figura 4. Establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Rubus idaeus</i> (frambuesa). A) Lavado de explantes en NaClO + Tween 20. B) Explantes enjuagados. C) Corte de segmentos nodales. D) Segmento nodal sembrado en tubo de ensayo.	34
Figura 5. Diseño del biorreactor: 1) Contenedor de cultivo. 2) Contenedor de medio. 3) Empaque de teflón. 4) Empaque de silicona. 5) Medio de cultivo. 6) Filtro de aire. 7) Manguera de silicona. 8) Conector de bronce.	34
Figura 6. Diagrama de flujo de las actividades.	39
Figura 7. Efecto de los tratamientos de desinfección en el porcentaje de explantes viables, oxidados y contaminados.	41
Figura 8. Explantes de frambuesa tras una semana de cultivo. A) Explante viable. B) Explante oxidado. C) Explante contaminado.	42
Figura 9. Brotes de <i>Rubus idaeus</i> (frambuesa) variedad Heritage tras 4 semanas de introducción <i>in vitro</i> .	43
Figura 10. Partes del biorreactor. A) Contenedor de medio de cultivo. B) Contenedor de material vegetal. C) Mangueras con filtro de goma espuma. D) Manguera de conexión entre contenedores.	45
Figura 11. Diseño del filtro de aire a base de espuma.	45
Figura 12. Biorreactores en funcionamiento con sus respectivas bombas de aire y temporizadores.	46

Figura 13. Diseño operativo del biorreactor. 1) Periodo estacionario. 2) Distribución del medio líquido. 3) Tiempo de inmersión. 4) Drenado de medio.	47
Figura 14. Comparación de tiempos y frecuencias de inmersión para la altura de brotes obtenidos en multiplicación por biorreactor.	49
Figura 15. Comparación de tiempos y frecuencias de inmersión para CM de brotes obtenidos en multiplicación por biorreactor.	51
Figura 16. Porcentaje de enraizamiento por cada tratamiento utilizado.	53
Figura 17. Comparación de los porcentajes de enraizamiento según los tratamientos utilizados a 15 y 30 g/L de sacarosa.	57
Figura 18. Brotes multiplicados de frambuesa variedad Heritage. A) Brotes multiplicados <i>in vitro</i> . B) Brotes multiplicados en biorreactor.	61



INTRODUCCIÓN

Rubus idaeus (frambuesa) es un arbusto leñoso y perenne de la familia de las Rosáceas, del género *Rubus*. Es una planta que se adapta al clima frío^[1], cuyo fruto es popular y atractivo por su contenido bioactivo^[1-3] y es altamente demandado a nivel mundial.

Su fruto es de color rojo gracias a su contenido en antocianinas y ha demostrado ser beneficioso para la salud debido a su alto contenido en fibra, antioxidantes^[3-5] como flavonoides, taninos, estilbenoides y ácidos fenólicos, así como vitamina B7, C, K y E^[4-6]. Además, se ha demostrado que la frambuesa tiene propiedades anticancerígenas, en el control de diabetes, obesidad y enfermedades neurodegenerativas usando su fruto, hojas y raíces^[4].

El cultivo de frambuesa está en constante crecimiento y competitividad a nivel mundial. Según la FAO, principales productores de frambuesa son Rusia, México, Polonia, Serbia y Estados Unidos^[7]. Perú tiene gran potencial para competir en el mercado internacional como actualmente hace Chile y México^[8]. Sin embargo, la disponibilidad y los métodos de propagación convencional de la frambuesa no son muy eficientes para incrementar el número de plantas en campo^[9].

Existen muchas variedades de frambuesa^[10] como Meeker, Heritage y variedades Santas cultivadas en Chile; Maravilla, Carmina y Erika en México; y variedades europeas como Willamette, Polka y Polana. Según International Raspberry Organization (IRO), la variedad cultivada en Perú es Heritage, siendo la más adecuada para el cultivo en Arequipa^[11], ya que es una variedad de fructificación bianual y su fruto puede ser destinado al consumo en fresco y congelado^[12].

La frambuesa a nivel comercial se propaga por hijuelos y brotes etiolados^[10], pero no aseguran una propagación uniforme o libre de enfermedades. Asimismo, existen métodos modernos como el estaquillado de raíz, pero se necesitan plantas madres óptimas obtenidas por técnicas biotecnológicas^[1].

Las técnicas biotecnológicas de cultivo *in vitro* y micropropagación permiten multiplicar por clonación especies de plantas libres de virus, con las características deseadas y subsanando la eficiencia de la propagación convencional^[9,13]. También, existe un gran interés por el uso

de biorreactores de inmersión temporal, que brindan una mejor eficiencia y mayor producción de plantas [14,15].

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo contribuir con el desarrollo de un protocolo para la propagación *in vitro* de *Rubus idaeus* (frambuesa) variedad Heritage a partir de segmentos nodales utilizando biorreactores de inmersión temporal (BIT), permitiendo la producción de un mayor número de plantas en un menor tiempo y espacio, así como un mayor tamaño y mejor adaptabilidad a la aclimatación.



HIPÓTESIS

Dado que la frambuesa es un producto de interés comercial, cuya propagación convencional es insuficiente, y la aplicación de biorreactores de inmersión temporal ha mostrado una mayor eficiencia en su micropropagación a nivel mundial, es probable que se pueda desarrollar un protocolo adecuado para el establecimiento, multiplicación en biorreactor de inmersión temporal y enraizamiento *in vitro* para *Rubus idaeus* (frambuesa) variedad Heritage, evaluando métodos de desinfección de segmentos nodales, condiciones de cultivo como tiempo, frecuencia de inmersión, reguladores de crecimiento y concentraciones de sacarosa.



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un protocolo para establecimiento, multiplicación en biorreactor de inmersión temporal (BIT) y enraizamiento *in vitro* de *Rubus idaeus* (frambuesa) variedad Heritage a partir de segmentos nodales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto de tratamientos de desinfección en diferentes tiempos de exposición en segmentos nodales como explantes de *Rubus idaeus* (frambuesa).
2. Diseñar y construir un biorreactor de inmersión temporal basado en el modelo SETIS™ para la fase de multiplicación *in vitro* de *Rubus idaeus* (frambuesa) variedad Heritage.
3. Determinar la frecuencia y tiempo de inmersión óptimos en biorreactor de inmersión temporal para la fase de multiplicación de los explantes de *Rubus idaeus* (frambuesa) variedad Heritage.
4. Evaluar el efecto de las auxinas AIA, IBA, ANA en la fase de enraizamiento de explantes de *Rubus idaeus* (frambuesa) variedad Heritage en medio ½ MS.
5. Evaluar el efecto de la reducción de la concentración de sacarosa en la multiplicación y enraizamiento de *Rubus idaeus* (frambuesa) variedad Heritage.
6. Comparar la eficiencia de cultivo *in vitro* frente a cultivo en biorreactor de inmersión temporal en la fase de multiplicación de *Rubus idaeus* (frambuesa) variedad Heritage.

TABLA DE VARIABLES E INDICADORES

Tabla 1. Variables e indicadores.

Tipo de variable	Variable	Indicadores	Unidades
Independientes	Tiempo de exposición en desinfectante	Tiempo de exposición de explantes en el desinfectante.	minutos
	Frecuencia de inmersión	Número de veces de inmersión de explantes en medio de cultivo en un día.	veces al día
	Tiempo de inmersión	Tiempo de inmersión de explantes en medio de cultivo.	minutos
	Auxinas	Concentración de auxinas en el medio de cultivo.	mg/L
	Ambiente de multiplicación	Uso de biorreactor y uso de medio semisólido.	Biorreactor / <i>in vitro</i>
	Concentración de sacarosa	Concentración de sacarosa en el medio de cultivo.	g/L
Dependientes	Fenolización/oxidación	Coloración negra o parda en el explante.	si / no
	Viabilidad	Sobrevivencia de los explantes.	explantes vivos / total de explantes
	Desarrollo de explante	Longitud de brotes. Brotes axilares.	cm unidades
	Eficiencia de multiplicación	Coefficiente de multiplicación.	de brotes finales/ brotes iniciales
	Desarrollo de raíz	Longitud de raíz. Número de raíces.	cm unidades

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1. Generalidades de la Frambuesa

1.1. Taxonomía

De acuerdo con la base de datos de United States Department of Agriculture (USDA), la frambuesa tiene la siguiente clasificación ^[16]:

- Reino: Plantae
- Subreino: Tracheobionta
- Superdivisión: Spermatophyta
- División: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Subclase: Rosidae
- Orden: Rosales
- Familia: Rosaceae Juss. - Familia de rosas P
- Género: Rubus L. - mora P
- Especies: Rubus idaeus L

1.2. Descripción botánica

La planta del frambueso es un arbusto leñoso que se caracteriza por ser caducifolio, perenne y de hábito bienal ^[1,2]. Durante los primeros años de vida los brotes se desarrollan de yemas vegetativas además de la base de las cañas y cuando envejecen mayormente provienen de la base de los tallos ^[17].

Su raíz sólo abarca los primeros 30 cm del suelo y nace de una estructura llamada “corona” ^[3]. Se caracteriza por tener en gran parte raíces delgadas (fibrosas), aunque posee algunas raíces gruesas que son las encargadas de sostener la planta y generar nuevos brotes gracias a yemas adventicias ^[1]. La cantidad de retoños que produce la raíz varía de acuerdo a la variedad y la edad de la planta ^[1,17].

Los tallos son bianuales y erectos, al tener un año se arquean debido a los frutos y dependiendo del cultivar pueden estar cubiertos de algunas espinas ^[2,17], Puede diferenciarse

de acuerdo a su etapa de crecimiento; se le llama primocaña a brotes jóvenes de primer año y floricaña a cañas lignificadas de dos años, en esta última etapa se da la fructificación ^[1].

En cuanto a las hojas son de forma ovalada con borde aserrado y nervios marcados, son alternas, compuestas y estipuladas formadas con cinco o siete folíolos; además, el color del haz es verde y el envés tiene un tono blanquecino con abundante velloso ^[1].

Las flores de frambueso son pequeñas conformadas por una corola con cinco pétalos blancos y aproximadamente cincuenta estambres y de sesenta a cien pistilos ^[17]. Contienen una gran cantidad de polen y néctar que atraen a polinizadores como las abejas ^[1].

Los ovarios fecundados dan origen a drupas que se agrupan alrededor de un receptáculo, formando así al característico fruto de la frambuesa ^[3,17]. Cada drupa rodea a una pequeña semilla con pulpa jugosa, su sabor se caracteriza por ser acidulado y aromático. La fruta generalmente es de color rojo, pero existen cultivares que tienen frutos de color amarillo, púrpura y negro ^[1,17].

1.3. Composición química y propiedades nutraceuticas

La frambuesa se ha convertido en una fruta popular entre los consumidores, ya que posee un aroma atrayente y se le considera dentro de las “súper comidas” por su contenido bioactivo ^[6]. En medicina tradicional se ha usado por mucho tiempo para tratar diferentes enfermedades y se les atribuye a las hojas actividad antimicrobiana y anti cancerígena ^[6].

Los principales antioxidantes que podemos encontrar en su composición son flavonoides (antocianinas, flavonoles y flavanoles), taninos (proantocianidinas, elagitaninos y galotaninos), estilbenoides, ácidos fenólicos (fenilpropanoide) y lignanos, además contiene vitaminas (biotina, ácido ascórbico, vitamina K y E), magnesio, hierro y omega-3 ^[4-6]

Del grupo de los taninos, el que tiene una mayor concentración en la frambuesa a comparación de otras frutas son los elagitaninos, estos compuestos representan hasta el 50% de actividad antioxidante ^[4]. Las antocianinas son las responsables del color rojo de las variedades de frambuesa roja y contribuye alrededor del 20 o 25% de actividad antioxidante ^[4,6].

En cuanto a los ácidos fenólicos se han detectado en frambuesa los siguientes: ácido p-cumárico, ácido cafeico y ácido cafeoilquínico ^[4], aunque su concentración está en menor medida junto con los flavonoles y flavanoles ^[3].

Los componentes de la frambuesa han demostrado tener beneficios en la salud humana; tiene actividad anticancerígena a través de mecanismos como la inducción de enzimas metabolizadoras, modulación de la expresión de genes y su efecto en la proliferación celular, apoptosis y vías de señalización subcelular [5]. En especial los elagitaninos son eficaces contra el cáncer de cuello uterino, principalmente su componente Sanguina H6 (mayor concentración en frambuesas rojas), que también es eficaz en modelos de inflamación celular [4]. El ácido elágico (forma simple de los elagitaninos) tiene la propiedad de evitar la reacción en cadena de radicales libres [18].

Adicionalmente, los taninos evidencian actividad inhibidora de la enzima alfa-amilasa, positivo para el control de glucosa en diabetes tipo I [4]. En estos estudios la acción contra la enzima alfa-glucosidasa, la segunda enzima relacionada con la síntesis de glucosa a partir de almidón, variaba en relación con el contenido de polifenoles. Existen estudios en ratas que demuestran que los polifenoles ayudan a mantener la secreción de insulina y la protección contra la oxidación de las células beta, pero aún no se ha estudiado con extractos de berries (bayas) [4].

Otras enfermedades en las que podría intervenir favorablemente serían en enfermedades cardiovasculares, diabetes, obesidad y en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer [4].

1.4. Variedades

Actualmente se puede encontrar muchas variedades de frambuesa porque existen diversos programas de mejora genética que modifica las variedades tradicionales [10]. Se pueden clasificar por las características de sus frutos, por la resistencia a plagas, hábito de crecimiento, origen, objetivo de producción o la forma de fructificar [1,12]. En este trabajo utilizaremos la clasificación por su forma de fructificar:

1.4.1. Variedades remontantes

Se denomina remontante a las variedades que dan dos cosechas por temporada, una es al final del verano y la otra entre primavera y verano [1,10].

- Heritage: Esta variedad fue liberada en 1969 por la Universidad de Cornell en Estados Unidos, es la más cultivada en el mundo [15,19]. Es una variedad con un comportamiento promedio, sus frutos son medianos (2.2 g), de color rojo brillante, de buena consistencia y dulzor (12.8° Brix); puede ser destinada al consumo en

fresco y para congelado ^[12]. Su maduración es tardía pero muy productiva y de largo periodo de cosecha ^[1]. La segunda cosecha, proveniente de los hijuelos, es de mejor calidad ^[10,12].

Lo atractivo de este cultivar para los agricultores es que es bastante resistente a diversas enfermedades, se adapta fácilmente a climas y sus cañas no se doblan como lo hacen otras variedades ^[10,20].

- Amity: Se caracteriza por requerir más de 1300 horas de frío para un buen rendimiento ^[10]. Su fruto tiene un color rojo oscuro con tonalidades moradas, su forma varía entre redonda y cónica. Su cosecha es complicada debido a que la fruta tiene una fuerte adhesión al receptáculo ^[1].
- September: Su fruto es grande y de buena calidad, aunque su desprendimiento es difícil, se puede usar para comercializar en fresco o congelado. Su maduración es temprana, productiva y tiene un largo periodo de cosecha ^[1].
- Autumn Bliss: Esta planta tiene espinas moradas con brotes vigorosos y erectos. Su fruto es grande de forma cónica, tiene un mejor sabor y aroma que Heritage pero es de consistencia blanda con fuerte adherencia al receptáculo, lo que la hace inadecuada para la comercialización en fresco ^[1,10].
- Fallgold: Su fruto es amarillo de poca acidez con buen sabor y aroma, es adecuado para pequeños huertos familiares ^[1].
- Ruby: Planta sin espina y generación abundante de retoños ^[10]. Su fruto es similar al de Heritage ^[1]. Su desventaja es la forma irregular de maduración del fruto, que afecta directamente a su calidad ^[15].
- Polka: Su rendimiento es alto y su fruto es de buen tamaño con forma cónica, de fácil manipulación y transporte ^[1].
- Himbo Top®: Es una variedad suiza que se caracteriza por ser rústica, especialmente es resistente a *Phytophthora rubii* ^[1].
- Maravilla: Propiedad de la empresa Driscoll's, tiene una mejor post-cosecha a comparación a otras especies y su fruto es de buen tamaño y sabor ^[1].
- Sugana, Erika y Amira: Provenientes de Italia, cultivares producto de cruces entre Autumn Bliss (Sugana y Erika) y Polka (Amira) con Tulameen ^[1]. Tienen colores claros y se caracterizan por ser productivas. El fruto de Sugana tiende a desgranarse al momento de la recolección ^[1].

- Pacific Delux, Santa Catalina, Santa Clara y Santa Teresa: Cultivares originarios de Chile. Pacific Delux es propiedad del grupo Hortifrut S.A. Se caracteriza por ser vigorosa y resistente a enfermedades ^[1]. Los tres cultivares Santa son similares, de crecimiento semi-erecto y de excelente rendimiento (doblando a Heritage) ^[10].

1.4.2. Variedades no remontantes

- Meeker: Liberada en 1967 en Washington, es otra de las variedades más cultivadas en el mundo ^[20]. Planta bastante espinosa y vigorosa, de exigente acumulación de frío; no es sensible a enfermedades, pero no es adecuada para zonas altas ^[1,10]. La calidad de su fruto para congelado rápido o individual Quick Frozen (IQF) es la mejor ^[10,20].
- Chilliwack: Su fruto tiene buenas características, buena resistencia a la pudrición post-cosecha y responde bien a la cosecha mecanizada ^[10,12]. Su desventaja es la sensibilidad a la infección de *Agrobacterium tumefaciens* ^[10].
- Comox: De alta productividad y fruto redondo, es ideal para ser procesado, pero no para cosecha mecanizada ^[10].
- Tulameen: Originaria de Canadá, su fruto es grande de color rojo brillante y firme ^[1]. Es ideal para el mercado en fresco, pero es sensible al ataque de *Botrytis* y *Phytophthora* ^[10]. Es la principal referencia de calidad para las frambuesas ^[1].
- Glen Magna: Variedad ideal para la industria del congelado ya que su fruto es grande, cónico y su color rojo se conserva durante el procesado ^[15].
- Glen Lyon: Variedad escocesa sensible a infecciones fúngicas, su fruto es redondeado, mediano y de buena vida post-cosecha. Se adaptó bien al sur de España por el clima seco ^[1].
- Gradina: Variedad resistente a la sequía y sensible a *Botrytis*, es adecuada para su distribución en fresco y la industria ^[1].
- Malling Exploit: Es una planta frágil pero resistente al frío, ideal para cultivar en zonas altas ^[1]. Su fruto es rojo y de sabor suave, soporta sequías, pero no el encharcamiento. Es adecuada para su consumo en fresco, aunque no soporta la manipulación ni el transporte ^[1].
- Schoenemann: Es una planta bastante sensible a la cantidad de agua en el suelo y a bajas temperaturas, pero tiene un alto rendimiento y su fruto es adecuada para comercializar en fresco y congelado ^[1].

- Skeena: Tiene resistencia a bajas temperaturas, su fruto es apto para el mercado en fresco o congelado ^[10].
- Willamette: Resistente al frío invernal pero no a heladas primaverales, sensible a Botrytis. Su fruto es mediano y de un color rojo-púrpura que se caracteriza por sabor suave y poco aromático ^[1].

1.5. Condiciones de cultivo

El frambueso proviene de regiones templadas en el Norte de Asia y Europa Oriental, por lo que su óptimo desarrollo se da entre 14 y 19°C ^[10]. Se puede adaptar a diversos climas, aunque dependiendo de la especie y cultivar necesita un reposo invernal (horas frío) ^[1]. La temperatura es un factor importante, las bajas temperaturas o mayores a 22°C pueden influenciar en el desarrollo, comportamiento productivo y la calidad de la fruta ^[1,10]. La temporada de lluvia y los vientos fuertes afectan negativamente a la fructificación, es recomendable su cultivo bajo plástico ^[1,10].

Requiere una humedad relativa entre 60 - 70% durante la plantación y 40% durante la cosecha, se debe evitar encharcamiento ya que aumenta el riesgo de infecciones fúngicas en las raíces ^[10]. Las técnicas de riego comúnmente usadas son mediante surcos, riego por goteo, microaspersión, microjet o cinta ^[20].

Se puede adaptar a diversos tipos de suelos, pero el suelo ideal es aquel que sea liviano (arenoso), con abundante materia orgánica, un pH entre 6-7 y menos de 150 ppm de concentración en bicarbonatos, cloruro y sodio ^[1,10,21]. Como todo frutal es indispensable una buena preparación del terreno de cultivo para un mejor desarrollo de las raíces ^[21].

Para el establecimiento del cultivo es aconsejable usar plantas en estado vegetativo que provengan de producción *in vitro* ^[10]. La distancia entre cada hilera debe ser entre 2,5 a 3 metros y si se quiere usar maquinaria hasta 3.5 metros; colocar dos plantas en medio metro lineal y adicionalmente usar sistemas de conducción según lo requiera la planta ^[21].

La poda de la frambuesa es importante, debe programarse de acuerdo a los hábitos de producción de los cultivares, de las estaciones y según el objetivo de producción ^[10,20].

1.6. Técnicas de propagación en campo

El frambueso es propagable ya sea por método sexual o asexual; el uso de las semillas solo es aplicable cuando se tiene como objetivo generar una nueva especie. La utilización del

método asexual generalmente es para producir plantas de viveros o huerto comercial ^[1]. A continuación, detallaremos las técnicas utilizadas para propagar en campo el frambueso:

1.6.1. Técnica tradicional

Esta técnica consta del establecimiento de un vivero en donde las plantas se colocarán a menor distancia que en un huerto para comercialización ^[10]. Esto tiene como objetivo producir nuevos brotes directos de la estructura radical para volver a plantarlos ^[1,10]. Aunque es una técnica aceptada y correcta, no garantiza que las plantas resultantes estén sanas ^[1].

1.6.2. Técnicas modernas

a. Propagación por brotes etiolados

Se debe contar con plantas madre micropropagadas *in vitro* para garantizar la calidad genética y sanitaria ^[10]. Luego se cosechan las raíces en invierno, se desinfectan y cortan en pedazos de 10 cm aquellas que tengan 3 mm de diámetro. Se siembran en un invernadero y se espera a que los brotes tengan 3 o 4 hojas para cortar antes de la inserción de la raíz, dejando una parte blanquecina (etiolado). Estos brotes pasan por un proceso de enraizado y cuando la planta llega a 10 o 15 cm pasa a terreno de cultivo ^[10].

b. Estaquillado de raíz

Consiste en cortar el sistema radical por debajo de la corona de la planta, seleccionar raíces de 2 a 5 mm de diámetro y cortarlas en pedazos de 5 o 7 cm ^[1]. Se desinfecta y se lleva a refrigerar por dos o tres semanas. Como siguiente paso, las raíces se colocan en cajoneras bajo un túnel de plástico para la generación de brotes (dura tres semanas). Por último, se repican estos brotes en “pots” individuales y se espera a que tengan entre 10 y 15 cm de longitud para pasarlos a tierra ^[1].

Las plantas madre deben haber sido obtenidas de micropropagación *in vitro*, estar en contenedores individuales y renovarse cada dos o tres años ^[1]. Si las plantas se colocan en campo durante el invierno deben tener más de tres meses para que tenga mayor resistencia al frío ^[22].

1.7. Importancia económica

La demanda de las frambuesas va aumentando exponencialmente en el mundo, debido al interés de los consumidores por beneficios para la salud ^[2]: Una taza de frambuesas puede aportar 40% de vitamina C requerida y 32% de fibra ^[16].

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la producción mundial de frambuesas en el año 2020 ascendió a 895 771 toneladas ^[7]. Los principales productores de frambuesa son la Federación de Rusia, México, Polonia, Serbia y Estados Unidos. El país con mayor rendimiento promedio mundial es Suiza con 22,8 toneladas/hectárea, siguiendo México, España y Portugal ^[7].

La producción de frambuesa fresca en México tiene como principal destino Estados Unidos, tuvo un gran crecimiento en los últimos diez años debido a la participación de empresas norteamericanas ^[23]. Estados Unidos por su parte destina el 25% de producción para industria y 75% para consumo local de fruta fresca, maneja distintas variedades con un gran rendimiento ^[23]. Chile hasta no hace mucho era de los principales países productores a nivel mundial llegando a obtener hasta 60 000 toneladas al año, el 95% de frambuesa es para comercialización en congelado ^[8,23].

En Perú no existe una industria establecida para la frambuesa aún, pero en 2022 según IRO (International Raspberry Organization) el cultivo de frambuesa ocupaba 130 hectáreas, con una producción de 800 toneladas, de las cuales se exportó 5.5 toneladas con un valor de 16 000 dólares como muestras a distintos países ^[8,24]. La frambuesa es una de las berries con potencial de producción en nuestro país y está incluida en el programa de berries de Sierra y Selva Exportadora ^[8,25].

2. Cultivo de tejido vegetal *in vitro*

El cultivo de tejidos vegetales consiste en varias técnicas para cultivar células, tejidos u órganos vegetales en medios artificiales y con un ambiente controlado ^[13,26]. Esta tecnología se basa en la capacidad de las células vegetales de volver a su estado meristemático y generar tejidos, órganos o una nueva planta en condiciones favorables, conocida como totipotencia ^[27,28]. Puede darse con crecimiento desorganizado (agregados celulares) y crecimiento organizado (formación de una estructura definida) ^[26].

2.1. Cultivo de órganos

Existen dos tipos de órganos cultivables:

- a. Órganos definidos: Su desarrollo ya está definido con tamaño y forma; pueden ser hojas, flores o frutos. Al ser meristemas limitados a la formación de un órgano específico no es adecuado para la reproducción de plantas ^[26].

- b. Órganos indeterminados: Se caracterizan por su crecimiento ilimitado y organizado; se incluyen a los meristemas (apicales y axilares) y brotes sin flores. Se aplica para la propagación de plantas [26]. En este grupo también está el cultivo de embriones, puede ser usado para el inicio de cultivo de callos o la germinación de semillas con incompatibilidad postcigótica producto del cruce de especies [26].

2.2. Cultivo de células desorganizadas

En este grupo se incluye el cultivo de callos; que son conjunto de células sin forma que se multiplican desordenadamente [13,26]. Se aplica para iniciar cultivos unicelulares o suspensión de células, para estudios morfogénicos y fisiológicos, producción de metabolitos secundarios y generar variaciones somaclonales [27].

La suspensión de células se da en medio líquido con agitación para que las células no se agrupen [26,27]. Se usa en estudios de bioquímica, fisiología celular, producción de metabolitos secundarios y experimentos de ingeniería genética [13,26]. Si se inmovilizan las células en medio solidificado se utiliza para micropropagación [26].

2.3. Cultivos unicelulares

Los protoplastos son células vegetales que no tienen pared celular [26]. Su cultivo es muy importante para muchas técnicas de manipulación genética [13]. Varios estudios han demostrado que para la multiplicación de plantas es factible, aunque no es utilizado para ese fin [26].

2.4. Micropropagación

La micropropagación se basa en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, cuyo principal objetivo es la propagación vegetativa de especies vegetales ornamentales, medicinales o de gran interés comercial [3,13]. Actualmente se le considera una industria rentable en todo el mundo [3].

Se puede dar por tres vías dependiendo de la especie y las condiciones de cultivo: yemas adventicias preexistentes, producción de yemas de novo y embriogénesis somática [6,29].

Los protocolos de micropropagación tienen como finalidad la multiplicación rápida de la planta de interés y además que conserve su material genético [8]. El éxito y la calidad de las plantas clones depende en gran medida de las plantas madre [6].

a. Ventajas

La micropropagación tiene ventajas con respecto a la propagación convencional en campo, ya que requiere pequeñas cantidades de espacio con mayor tasa de producción y en menor tiempo [26,30]. Los cultivos se pueden dar a partir de pequeñas fracciones de la planta (explante) y puede liberar de infecciones por virus [30]. Las plantas obtenidas se catalogan como clones, ya que conservan la información genética y fenotípica, por lo que son más deseables para el agricultor [13,30]. La producción no depende de estaciones y el procedimiento no requiere mucha mano de obra ni materiales [13].

b. Desventajas

Se necesita un ambiente con equipos especializados, aumentado el coste de producción [26]. Las plantas se mantienen en recipientes cerrados, las plántulas son más delicadas y pueden perder agua al exterior fácilmente y no son autótrofas (no hacen fotosíntesis). Requieren de un periodo de adaptación para poder establecerse en campo [26]. Otra limitante es la poca disposición de protocolos para especies difíciles de establecer *in vitro* (plantas recalcitrantes) y la tendencia a variaciones somaclonales de algunos tipos de plantas [30].

2.4.2. Etapas de la micropropagación

a. Etapa 0, Preparación y selección de la planta madre

Se selecciona a las plantas madre, deben tener una buena apariencia sin rastro de alguna infección o enfermedad [26]. Debe contar con las características agronómicas para ser propagada y ser típica de la especie o variedad de interés [26,30].

Las plantas que cumplan las anteriores características deben ser aisladas en un ambiente cerrado con buen control sanitario [30]. Puede aplicarse algún tratamiento para evitar la infección y contaminación de la planta, la poda también se sugiere para estimular crecimiento de yemas y realizar evaluaciones periódicas para evaluar la salud de la planta [26,30].

b. Etapa 1, Establecimiento del cultivo

Este paso consiste en colocar los explantes en el medio de cultivo artificial en condiciones asépticas [26]. La desinfección superficial se realiza en esta etapa, comúnmente se utiliza hipoclorito de sodio (0.5 a 1.5%), etanol al 70% y algunos tensoactivos; incluye un minucioso enjuague con agua destilada estéril [29].

El resultado depende del grado de adaptación del explante e involucra varias fases^[30], donde los materiales vegetales que demuestran mayor regeneración son tejidos meristemáticos jóvenes^[29]. En la primera fase o de aislamiento, el explante sufre estrés, debido a la separación de la planta madre, que puede producir fenolización o crecimiento exagerado de órganos vegetales. La segunda fase es de estabilización, donde hay crecimiento variable y no proporcionado. Por último, la etapa de producción en la que ya se da la adaptación del explante, donde las respuestas fisiológicas son proporcionales al espacio reducido y los suplementos del medio de cultivo^[30].

c. Etapa 2, Multiplicación

El principal objetivo de esta etapa es aumentar la producción de brotes para los siguientes subcultivos^[26,29]. El medio se suplementa únicamente con citoquininas o en conjunto con pequeñas cantidades de auxinas, donde se debe determinar sus concentraciones por evaluación para evitar la formación de callos y disminuir el riesgo de variación somaclonal^[29,30].

El número de subcultivos se relaciona con el genotipo, la tasa de multiplicación, el crecimiento adventicio y la variabilidad genética^[30].

d. Etapa 3, Enraizamiento

En esta etapa se da la formación de raíces adventicias, cambiando a un medio que este suplementado con mayor cantidad de auxinas^[29,30].

La capacidad de enraizar es variable entre las especies^[31], entonces la selección de la auxina y su concentración se deben definir según el tipo de planta y así evitar la formación de callos en la base^[30].

Esta etapa es la más costosa^[26,30], por eso a veces se emplea el enraizamiento *ex vitro* (fuera del recipiente del cultivo) que juntaría las dos últimas etapas de la micropropagación; los sustratos usados son la perlita o vermiculita o ambas junto con medio nutritivo^[26,29,30]. Algunas especies requieren solo enraizamiento *in vitro* para una buena adaptación^[30].

e. Etapa 4, Aclimatación (trasplante al medio ambiente)

Las plantas que se desarrollan *in vitro* tienen nutrición heterotrófica y son ineficientes para controlar la deshidratación^[30,31]. La aclimatación tiene como objetivo obtener una gran cantidad de plantas adaptadas a condiciones ambientales normales^[30]. Para que la planta no

entre en estrés se le coloca en recipientes con sustrato adecuado en ambientes controlados [26,31]. Se empieza con condiciones parecidas a las *in vitro* y se reducen de forma gradual para mejorar el desarrollo y funcionamiento de los órganos [30,31]. Este proceso puede durar varias semanas hasta que la planta tenga control autónomo [30].

2.5. Condiciones de cultivo *in vitro*

Una vez hecho el establecimiento *in vitro*, el cultivo vegetal necesita unas condiciones ambientales tanto dentro como fuera del recipiente. El recipiente a utilizar depende del objetivo del cultivo, pero generalmente son de materiales transparentes y que puedan ser esterilizados en autoclave como el vidrio, Pyrex® (borosilicato), plásticos como el polipropileno y policarbonato [27]. Entre los plásticos el policarbonato suele ser mejor; ya que transmite cerca del 100% de la luz, mientras que el polipropileno solo un 65% [27]. Desde que se hizo el primer cultivo *in vitro* en tubos de ensayo, se han ido probando distintos contenedores como el “Carrel flask”, tubos de rodillo (roller tubes), tubos en forma de vaso (tumbler tubes), T-flasks, matraces Erlenmeyer, botellas Roux y placas Petri; que todavía son usados hasta ahora [32]. Con la micropropagación extendiéndose, se empezaron a utilizar frascos de vidrio, contenedores de plástico desechables pre esterilizados [27] y contenedores comerciales como Magenta™, Phytocon™, Phytatray™, etc [32].

La luz es fuente de energía para la fotosíntesis y formación de metabolitos secundarios en plantas [33]. Los tres aspectos de la luz que influyen en el cultivo *in vitro* de plantas son la longitud de onda (color), densidad de flujo (intensidad de la luz) y el fotoperiodo [26]. La fuente de luz puede ser natural o artificial. Se solía usar luz fluorescente, haluros metálicos e incandescencia; pero eventualmente se empezó a usar LEDs hasta la actualidad con muchos mejores beneficios. Además, el rango del espectro de luz usado es el visible (400-700 nm) [33]. El fotoperiodo más usado es el de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad y la intensidad de luz promedio es de 1000 lux ($14-15 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), pero dependiendo del objetivo y el genotipo puede variar [26].

La temperatura influye en los procesos de respiración y fotosíntesis [34]. La temperatura promedio usada es de 25°C con un rango de 17 a 32°C. Este factor puede mantenerse constante o imitar un poco la situación natural, donde la temperatura nocturna es más baja que la diurna, con un rango de disminución de la temperatura entre 4 a 8°C. La disminución de la temperatura nocturna puede mejorar el crecimiento de los cultivos, pero el efecto es genotipo dependiente entre especies [26].

Generalmente, se recomienda una humedad mayor al 70%, ya que una concentración menor desecaría los cultivos produciendo un menor crecimiento [26]. Por último, la concentración de gases tanto dentro como fuera del recipiente también es importante, siendo el oxígeno, dióxido de carbono y etileno los más significativos [34].

2.6. Medios de cultivo

El medio de cultivo o medio basal es el que brinda los nutrientes, energía y agua a las plantas *in vitro* [26,35]. Este medio basal está constituido por macronutrientes, micronutrientes, azúcar, vitaminas y un agente gelificante. Dentro de los macronutrientes se encuentran el nitrógeno, fósforo, potasio, sodio, magnesio, azufre, calcio y cloro. Los micronutrientes son manganeso, zinc, boro, cobre, molibdeno, silicio, yodo y hierro. Las vitaminas usadas opcionalmente en el cultivo vegetal *in vitro* son mioinositol, tiamina, piridoxina y ácido nicotínico. La finalidad de la adición de azúcar es la de tener una fuente de carbono, siendo la más efectiva y mayormente empleada la sacarosa entre 2-4% (20-40 g/L). Por último, los agentes gelificantes pueden ser agar, agarosa, goma gelán (Gelrite, Phytigel y Kelcogel) o alginato de calcio, con diferentes efectos cada uno [26,35].

El pH juega un rol importante en la absorción de los nutrientes del medio, reacciones químicas y la eficacia del gelificante. Como regla general, el pH del medio basal debe establecerse entre 5.5 y 6.0 inicialmente; ya que conforme va desarrollándose la planta *in vitro*, el pH irá cambiando [26].

El gelificante puede ser prescindido para trabajar en un medio basal líquido. Tienen la ventaja de tener una preparación más rápida, económica y los cultivos presentan mayor tasa de crecimiento frente a los medios sólidos [26,34].

El medio de cultivo basal más usado es el formulado por Murashige y Skoog (MS), ya que su concentración de sales se adapta a la mayoría de plantas [35]. Otro medio usado es el de Gamborg (B5), y existen muchos reportes de la modificación del medio MS en su concentración como ½ MS, además de usar una suplementación de vitaminas del medio B5. Otros formulados son el Woody Plant Medium (WPM) de Lloyd y McCown, y el de Driver y Kuniyuki (DKW) [35].

Tabla 2. Composición del medio Murashige Skoog (MS) de 1962.

Macronutrientes	Fórmula química	Concentración (mg/L)
Nitrato de amonio	NH_4NO_3	1650
Cloruro de calcio	CaCl_2	332.2
Sulfato de magnesio	MgSO_4	180.7
Nitrato de potasio	KNO_3	1900
Fosfato monopotásico	KH_2PO_4	170
Micronutrientes		
Ácido bórico	H_3BO_3	6.2
Cloruro de cobalto	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
Sulfato de cobre	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
Ácido etilendiaminotetraacético	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.26
Sulfato ferroso	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
Sulfato de manganeso	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16.9
Molibdato de sodio	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
Yoduro de potasio	KI	0.83
Sulfato de zinc	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
Vitaminas		
Glicina	$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	2
Niacina	$\text{C}_6\text{H}_6\text{NO}_2$	0.5
Mio-inositol		100
Piridoxina · HCl		0.5
Tiamina · HCl		0.1

Nota: Composición basada en el medio comercial de PhytoTechnology Laboratories.

2.6.1. Reguladores de crecimiento

Después de satisfacer los requerimientos de nutrientes de los tejidos vegetales en el medio basal, se pueden estimular más respuestas de desarrollo mediante la adición de reguladores del crecimiento [35]. Los reguladores del crecimiento vegetal son compuestos naturales o sintéticos, que a muy baja concentración pueden modificar el crecimiento o la morfogénesis de las plantas [26].

Las auxinas promueven en combinación con las citoquininas, el crecimiento de callos, suspensiones celulares, órganos, y regulan la dirección de la morfogénesis; pero, las auxinas son más conocidas por su capacidad para promover la formación de raíces adventicias [26]. Comúnmente, se usa ácido α -naftalenoacético (ANA), ácido indol-3-butírico (IBA) y ácido indol-3-acético (AIA) en cultivos de multiplicación de brotes y en enraizamiento [35]. Por otro lado, si el objetivo es la formación de callos, se suele aumentar la concentración de auxinas o usar más potentes como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el picloram (PIC) [35].

Las citoquininas estimulan la síntesis de proteínas y participan en el control del ciclo celular; y agregados a los medios de cultivo de brotes, superan la dominancia apical y liberan las yemas laterales de la latencia [26]. Dentro de las más usadas están benciladenina (BA) o 6-bencilaminopurina (BAP), kinetina (KIN), zeatina (ZEA), 2-isopenteniladenina (2-IP) y thidiazuron (TDZ) [35].

El ácido giberélico (GA₃) produce efectos similares a las auxinas [26]. Se usa en protocolos de elongación de brotes, pero también puede influir en el desarrollo de semillas y superar la latencia [35]. GA₃ puede mejorar el crecimiento y/o aumentar la tasa de proliferación de brotes, y existen varios reportes de éxito en combinación con BAP, pero el efecto puede variar entre especies y hasta en genotipos estrechamente relacionados (variedades o cultivares) [26].

Tabla 3. Reguladores de crecimiento comúnmente usados en el cultivo vegetal *in vitro*.

Tipo	Origen	Regulador	Abreviatura
Citoquinina	Natural	Zeatina	ZEA
	Natural	Isopentanol adenina	2-IP
	Natural/sintético	Kinetina	KIN
	Sintético	Bencilaminopurina	BAP / BA
	Sintético	Thidiazuron	TDZ
Auxina	Natural	Ácido indol-acético	AIA / IAA
	Natural	Ácido indol-butírico	IBA
	Sintético	Ácido naftalen-acético	ANA / NAA
	Sintético	Ácido diclorofenoxiacético	2,4-D
	Sintético	Picloram	PIC
	Sintético	Dicamba	DCA
Giberelina	Natural	Ácido giberélico	GA ₃
Ácido abscísico	Natural	Ácido abscísico	ABA
Jasmonato	Natural	Ácido jasmónico	JA
Antioxidante	Natural	Ácido ascórbico	ASA
	Sintético	Polivinilpirrolidona	PVP

Nota: Modificado de Phillips G. [35]

2.7. Problemas frecuentes en la micropropagación

2.7.1. Planta madre, genotipo y explante

La mayoría de estudios *in vitro* se centran en la manipulación del medio, ya sea por concentración de sales o reguladores de crecimiento [26]. Sin embargo, el primer problema relevante es la elección del explante, la planta madre (donadora de explantes) e incluso el genotipo. Existen innumerables estudios de optimización de medios para diferentes especies o incluso variedades. Un mismo medio puede funcionar para una variedad, pero tal vez no

funcionará para otra variedad de la misma especie. Durante el crecimiento y desarrollo de una planta, diferentes partes del código genético se expresan en diferentes células de ésta [26]. Además, factores como el tejido u órgano seleccionado para la escisión del explante, la temporada o las condiciones de crecimiento de la planta madre y su ontogenia, el corte y la orientación del explante en el medio influyen en la expresión génica y organogénesis [26,27]. Aun revisando todos estos factores, es necesario verificar la fidelidad genética de las plantas producidas *in vitro* a intervalos regulares para obtener plantas genéticamente uniformes [27].

2.7.2. Recalcitrancia

El conocimiento de la fisiología de la planta a micropropagar toma un rol importante también, ya que existen plantas con menor capacidad en la formación de brotes, raíces o alguna otra reacción que dificulta su propagación llamados recalcitrantes [26,27]. La recalcitrancia es la incapacidad de las células, tejidos y órganos vegetales para responder a las manipulaciones de cultivos *in vitro*. Además, es común que el tejido adulto de una planta sea más recalcitrante que el joven [36].

2.7.3. Hiperhidricidad

La hiperhidricidad, hiperhidratación o vitrificación es la formación *in vitro* de órganos anormales, que son frágiles y tienen una apariencia empapada de agua [26]. Puede traducirse como un control estomático deficiente, una capacidad fotosintética reducida, crecimiento radicular deficiente, se dañan fácilmente por la desecación y no sobreviven cuando se subcultivan o se aclimatan [26,27]. Esto ocurre debido a que los cultivos crecen en condiciones de alta humedad, el cierre del contenedor de cultivo, naturaleza física del medio, tipo y cantidad del agente gelificante, concentración y tipo de reguladores de crecimiento [27,36].

2.7.4. Consistencia del medio

El uso de medio líquido a menudo da como resultado tasas de crecimiento más rápidas frente a medios semisólidos [26]. Esto es debido a una mayor superficie de contacto del explante con el medio que permite una mayor absorción de nutrientes y reguladores de crecimiento. Pero como desventaja, debe tomarse en cuenta una aireación para evitar la hiperhidricidad de los explantes debido a la exposición continua al agua. El uso de medio semi-sólido disminuye en gran parte la hiperhidricidad a medida que aumenta la concentración de agar, pero puede haber una reducción concomitante en la tasa de crecimiento. Frente a esto una posible solución sería el combinar ambas fases de medio. Es decir, utilizar medio semisólido en la

etapa 1 de la micropropagación y usar medio líquido en las etapas 2 y 3, con posibilidad de volver a semisólido en la etapa 3 [26].

2.7.5. Contaminación

Una vez iniciado el cultivo *in vitro*, no debería haber pérdida por enfermedad, y deberían estar idealmente libres de bacterias, hongos y otros microorganismos [26]. Pero, puede no suceder así, y la contaminación por hongos se propaga tan rápido, que desechar los cultivos se convierte en la única forma de control [27]. La contaminación externa (epífitos) resulta de los laboratorios, los materiales utilizados y el personal, mientras que la contaminación interna por los microbios endófitos en las plantas madre [36]. El problema de la contaminación se ve agravado por bacterias latentes de crecimiento lento que no se detectan hasta en una etapa muy tardía. La infección latente también puede resultar en un crecimiento variable, necrosis tisular, proliferación reducida de brotes y enraizamiento [27]. Esto puede solucionarse con la adición de antimicrobianos, antifúngicos o mezclas de conservantes de plantas (PPM) en el medio de cultivo; sin embargo, puede haber una reducción en la multiplicación de brotes según el genotipo [36].

Otro grave problema es la presencia de trips y/o ácaros en las salas de cultivo. Estos diminutos insectos se multiplican rápidamente en la atmósfera o en los recipientes de cultivo causando severos daños en los cultivos. Si embargo, esto se puede controlar con un protocolo adecuado de asepsia de las instalaciones [27].

2.7.6. Oxidación/Fenolización

El pardeamiento de los explantes o pardeamiento fenólico ocurre naturalmente por la oxidación enzimática de los compuestos polifenólicos producidos por la misma planta. Esto inhibe el desarrollo vegetal volviendo los explantes necróticos y generando su muerte [27,36]. El grado de pardeamiento depende de la especie o genotipo de las plantas donantes, la edad del tejido (mientras más viejo, mayor pardeamiento), la época de inicio de los cultivos (invierno y otoño) y la composición del medio. La adición de antioxidantes como ácido ascórbico o ácido cítrico al medio de cultivo ayuda a controlar el oscurecimiento de los explantes y el medio. Otros adyuvantes son la polivinilpirrolidona (PVP) y el carbón activado que adsorbe fenoles [27,36]. Sin embargo, también pueden adsorber compuestos útiles del medio, por lo que su concentración debe estudiarse para cada caso [27]. Por otro lado, el uso de medio líquido también puede ayudar a disminuir el pardeamiento de los cultivos por una mejor dispersión de compuestos [26,27].

2.7.7. Variación somaclonal

La variación somaclonal son anomalías inducidas por el cultivo, inesperadas y no deseadas, que luego son heredadas por las progenies clonales [36]. La variación somaclonal depende del genotipo, el período de cultivo *in vitro* del explante, la concentración de auxinas y citoquininas, la tasa de proliferación de los tejidos, intervalo entre subcultivos, selección natural, mutaciones, nivel de ploidía y el modo de regeneración utilizado. Las variaciones somaclonales impiden obtener plantas fieles al tipo de la planta madre que se quiere propagar [36].

La variación somaclonal se reduce cuando la propagación se basa en la proliferación de brotes axilares en comparación con los meristemos, embriones y regeneración por callos [26]. El cultivo de segmentos nodales brinda mucha mayor estabilidad clonal y su uso es más frecuente e ideal para micropropagación de plantas [26]. Para superar la variación somaclonal se debe evitar los cultivos *in vitro* a largo plazo y la sobreexposición a las fitohormonas. Además, se debe reiniciar regularmente los clones a partir de nuevos explantes, el número de subcultivos debe mantenerse al mínimo y debe controlarse el uso de 2,4-D, KIN y TDZ, ya que estos reguladores inducen variaciones [36].

3. Biorreactores en el cultivo *in vitro*

Un biorreactor es un entorno estéril autónomo que aprovecha sistemas de entrada y salida de nutrientes líquidos y/o aire. Está diseñado para cultivos intensivos y a gran escala [14]. El objetivo de emplear biorreactores es proporcionar condiciones de crecimiento y desarrollo óptimas y controladas para lograr el máximo rendimiento y calidad del elemento biológico [37,38]. Los parámetros asociados al entorno del biorreactor son la circulación del medio, mezcla, aireación, suspensión celular, temperatura, pH y oxígeno disuelto [39,40]. Y en el caso del cultivo *in vitro* de plantas, los parámetros más importantes son la capacidad de cizallamiento, intercambio de gases, esterilidad, intercambio de medio y sincronización [39].

La producción de plantas a gran escala mediante el uso de biorreactores depende de estudios en requerimientos del genotipo de planta, la morfogénesis en medios líquidos y la comprensión de los complejos mecanismos de control del desarrollo de órganos y embriones a partir de meristemos o yemas [41].

3.1. Tipos de biorreactores

Actualmente hay muchos diseños de biorreactores para cultivo *in vitro* vegetal, por lo que es tarea del investigador seleccionar el mejor diseño o modelo para cada especie de planta [38,39].

El primer uso reportado para micropropagación fue en un biorreactor de columna de burbujas por Takayama y Misawa en 1981, y desde entonces fueron mejorando los diseños de los biorreactores para diferentes objetivos en el cultivo *in vitro* vegetal [41].

3.1.1. Inmersión continua

El sistema de inmersión continua es apropiado para la proliferación de propágulos sin hojas como los bulbos, microtubérculos y rizomas [42,43]. Pero, es más eficiente para la producción a gran escala de metabolitos [44].

Dentro de estos tipos de biorreactor se encuentran:

a. STR (Stirred Tank Reactor)

El biorreactor de tanque agitado o por sus siglas en inglés STR, consta de un impeller o agitador junto con diferentes puertos para aireación, adición o eliminación de medios, etc [39]. Es el más utilizado en cultivo celular por su fácil escalado, buena mezcla de fluidos, transferencia de oxígeno, etc; pero, tiene un alto consumo de energía y cizallamiento [38]. Generalmente, no se recomienda el uso de este tipo de biorreactor para cultivo vegetal, pero se ha reportado éxito en producción de metabolitos secundarios por raíces realizando modificaciones como el tipo de impulsor o disminución de agitación [38].

b. Air-Lift

El biorreactor de columna de aire o Air-lift es un tipo de reactor de dispersión gas-líquido, consta de un rociador, un contenedor, un tubo de aspiración lateral vertical sólido colocado dentro del contenedor, y varios puertos según sea necesario [39]. Demostró menor cizallamiento y mayor viabilidad celular que el STR para el cultivo de células vegetales [39,40], con éxito en cultivo de raíces peludas para producción de metabolitos secundarios [38].

c. Biorreactor de Columna de Burbujas

Este biorreactor consta de un recipiente cilíndrico que tiene un rociador de aire en la parte inferior, y ha sido usado en la producción a gran escala de plantas y metabolitos de alto valor

[39]. Las burbujas crean menos fuerza de cizallamiento y es útil para cultivo de órganos de plantas para propagación como brotes, bulbos y tubérculos [40]. Hay registro de mayor eficiencia en el cultivo de raíces peludas para producción de metabolitos secundarios en comparación del Airlift, debido a un ambiente de menor estrés [38], y en propagación de *Stevia rebaudiana* [39]. El problema de este biorreactor es la formación de espuma [40,45].

d. Biorreactor de burbujas tipo globo (BTBB) [38,39,42]

Es una modificación del biorreactor tipo Air-lift adecuada para la producción de metabolitos y biomasa a gran escala mediante el cultivo de raíces adventicias [38] y soluciona el problema de formación de espuma por la forma de globo del reactor [40]. Su uso es apto para el cultivo de células, tejidos y órganos vegetales [40].

e. Biorreactores de niebla [38,45]

Los reactores de lecho de fase gaseosa como el reactor de niebla, ofrecen una mejor disponibilidad de oxígeno y nutrientes, un mejor intercambio de gases y una tensión de cizallamiento reducida. Los sistemas rocían la solución de nutrientes en forma de aerosol sobre las superficies de los tejidos y órganos de las plantas, se recolectan en el fondo de los reactores y se reciclan continuamente a través del sistema [38,45].

f. Biorreactor de tambor rotatorio [39,45,46]

Este tipo de biorreactor muestra mayor eficiencia que el STR en cuanto a suministro de oxígeno y bajo cizallamiento. La velocidad de rotación y la tasa de aireación son clave para optimizar el proceso de cultivo en este biorreactor, pero genera ruptura de los cultivos de tejidos vegetales si no se inmovilizan, requiere alta energía en la producción a gran escala, es imposible establecer tiempos de inmersión y las opciones de ventilación son escasas [39,45,46].

g. Biorreactores desechables [43]

Suelen ser fabricados de polietileno o en bolsas selladas de polipropileno y esterilizados por radiación gamma. También son utilizadas bolsas de polímeros de fluorocarbono para darle permeabilidad al gas. Se reportó su empleo en micropropagación de plátano, papas, helechos y gladiolos; y para la producción de metabolitos secundarios. Algunos de los diseños de este tipo de biorreactor son el de Caja en Bolsa (Box-in-bag) y el Wave and Undertow (WU) [43].

La inmersión completa de las plántulas en el medio de cultivo causa cambios en la morfología de las plantas, hiperhidricidad, enanismo, crecimiento y desarrollo anormal de órganos, además de problemas de aclimatación y supervivencia de las plantas propagadas [41]. Existe una hiperhidricidad en particular para las especies dicotiledóneas, la mayoría de los brotes son etiolados, suculentos y se dañan fácilmente por el manejo y el estrés ambiental al aclimatar las plantas [43].

3.1.2. Inmersión temporal

Los biorreactores de inmersión temporal (BIT), sistemas de inmersión temporal (SIT) o "métodos de flujo y reflujo", ofrecen las ventajas de los cultivos en medio líquido sin la hiperhidricidad característica y es posible realizar una automatización del sistema [43]. Fueron diseñados para micropropagación de plantas reduciendo los costos de mano de obra, pero, también hay registros de su uso en cultivo de raíces por sus beneficios [38].

Los explantes se mantienen alejados del medio y el medio se almacena en un compartimento separado, en el mismo recipiente de los explantes, o en un reservorio separado [39]. Además, es crucial encontrar el equilibrio entre las frecuencias de inmersión y la duración de la inmersión para cada especie [41].

a. RITA®

El sistema RITA® es el más conocido y distribuido por VITROPIC. Está compuesto por dos compartimentos, comúnmente de policarbonato [43], el superior contiene los explantes y el inferior contiene el medio de cultivo líquido. Están unidos entre sí de manera que cuando se aplica una sobrepresión con aire en el compartimento inferior, el medio es empujado hacia el superior; generando una sumersión temporal de los explantes; y el medio líquido vuelve al compartimento inferior cuando cae la sobrepresión [14,47].

Existe una modificación más grande es el MATIS®, es un monobloque y tiene un filtro lateral, pero su boca ancha hace difícil su manipulación, aumenta la entrada potencial de contaminantes y presenta fallas en su cierre hermético [48,49]. También el biorreactor PLANTIMA® funciona bajo el principio del RITA®, utiliza volúmenes pequeños con la diferencia de que sus filtros de aire están dispuestos lateralmente, lo que le permite ser apilable [46,47].

b. Twin-Flask

El biorreactor tipo Twin-flask o frascos gemelos fue uno de los primeros diseños para la micropropagación en masa. Consiste en dos contenedores de boca ancha, ya sean botellas o frascos conectados en la parte superior por un tubo en U. En uno de los contenedores están los explantes, y en el otro el medio de cultivo. Cada contenedor tiene su propia línea de aire que ejerce presión para mover el medio líquido de un contenedor a otro y efectuar la inmersión temporal de los explantes ^[46]. Un biorreactor comercial producido en Brasil es el RALM ^[46,47,49].

c. Biorreactor de flujo y reflujo

Es una variante del Twin-flask, consiste en dos contenedores conectados por la parte inferior y diferentes niveles de altura. El contenedor que se coloca en la parte superior tiene los explantes y el contenedor inferior almacena el medio de cultivo. La inmersión se da cuando se ejerce presión de aire al contenedor de medio de cultivo y este pasa al contenedor superior, luego el medio retorna por gravedad. Tiene la ventaja de necesitar solo una entrada de aire, pero su armado se hace difícil al agujerear frascos de vidrio ^[46,47,49].

d. Biorreactor de inmersión por burbujas (BIB)

Este sistema brasilero consta de un solo cilindro, el cual tiene el medio de cultivo en el fondo, los explantes dispuestos en varias placas microporosas en forma de torre, una entrada de aire en la parte inferior y otra en la superior con filtro. El medio de cultivo está mezclado con Tween 20, y al ser inyectado con aire genera espuma que sube hacia los explantes y retorna por gravedad. Fue probado exitosamente en árbol del té y orquídeas, pero la mezcla con detergente puede generar problemas con plantas más sensibles ^[46].

e. Sistemas mecánicos: basculantes BioMINT™ y BioCoupler™

Estos sistemas utilizan una plataforma mecánica para inclinar el contenedor del biorreactor en un ángulo determinado y en su contrario. Las desventajas de este biorreactor son el costo de inversión en el sistema basculante electromecánico, el espacio por unidad y no existe una renovación de aire ^[46].

El biorreactor BioMINT™ funciona bajo este sistema, pero soluciona algunos problemas, ya que tiene entradas de aire forzado y son 2 recipientes cilíndricos (BioMINT™) o rectangulares (BioMINT™ II) unidos por un adaptador perforado que permite mantener los

explantes en un sitio. La inmersión ocurre mediante inclinaciones, esto hace mover el medio de un lado a otro [46,49].

Otro modelo de biorreactor mecánico es el BioCoupler™, desarrollado por Plant Cell Technology. Este biorreactor tiene forma de reloj de arena, consiste en dos frascos de vidrio conectados verticalmente mediante una tapa doble con filtro, además de un filtro de ventilación microporosa que mejora el problema de aireación. El funcionamiento es manual, donde el operador tiene que dar la vuelta entera al biorreactor para producir la inmersión temporal, y voltear de nuevo para devolver el medio. Este biorreactor tiene la desventaja de tener una operación manual, pero la empresa que lo produce diseñó un sistema para automatizar la inmersión.

f. PLANTFORM™

El sistema de este biorreactor es similar al RITA®, pero llevado a cabo en un contenedor rectangular grande. Dentro del biorreactor hay 2 compartimentos, el inferior contiene el medio líquido y el superior los explantes. La diferencia está en el tamaño, la forma y la existencia de una entrada adicional de aire, el cual funciona para brindar aireación al biorreactor sin movimiento del medio de cultivo, el cual puede ser enriquecido con CO₂ o aire ambiental. [49-51].

g. SETIS™

Fue diseñado para la micropropagación a gran escala y tiene el concepto del sistema Twin-flask. El biorreactor consiste en 2 recipientes, uno encima de otro y conectados por una manguera de silicona desde los fondos y cada uno tiene una manguera con filtro de aire. El superior es de 6L que contiene los explantes y el inferior es de 4L que contiene el medio líquido. Su operación consiste en 4 fases: la fase estacionaria, cuando esta todo en reposo y el medio de cultivo se encuentra en el recipiente inferior; la fase de inmersión, cuando se ejerce presión por la entrada de aire en el contenedor inferior generando que el medio líquido suba hacia los explantes del contenedor superior; la fase de drenado, en el que el medio regresa al contenedor inferior por gravedad; y por último, la fase de ventilación donde ocurre una aireación directamente al contenedor superior [49,52].

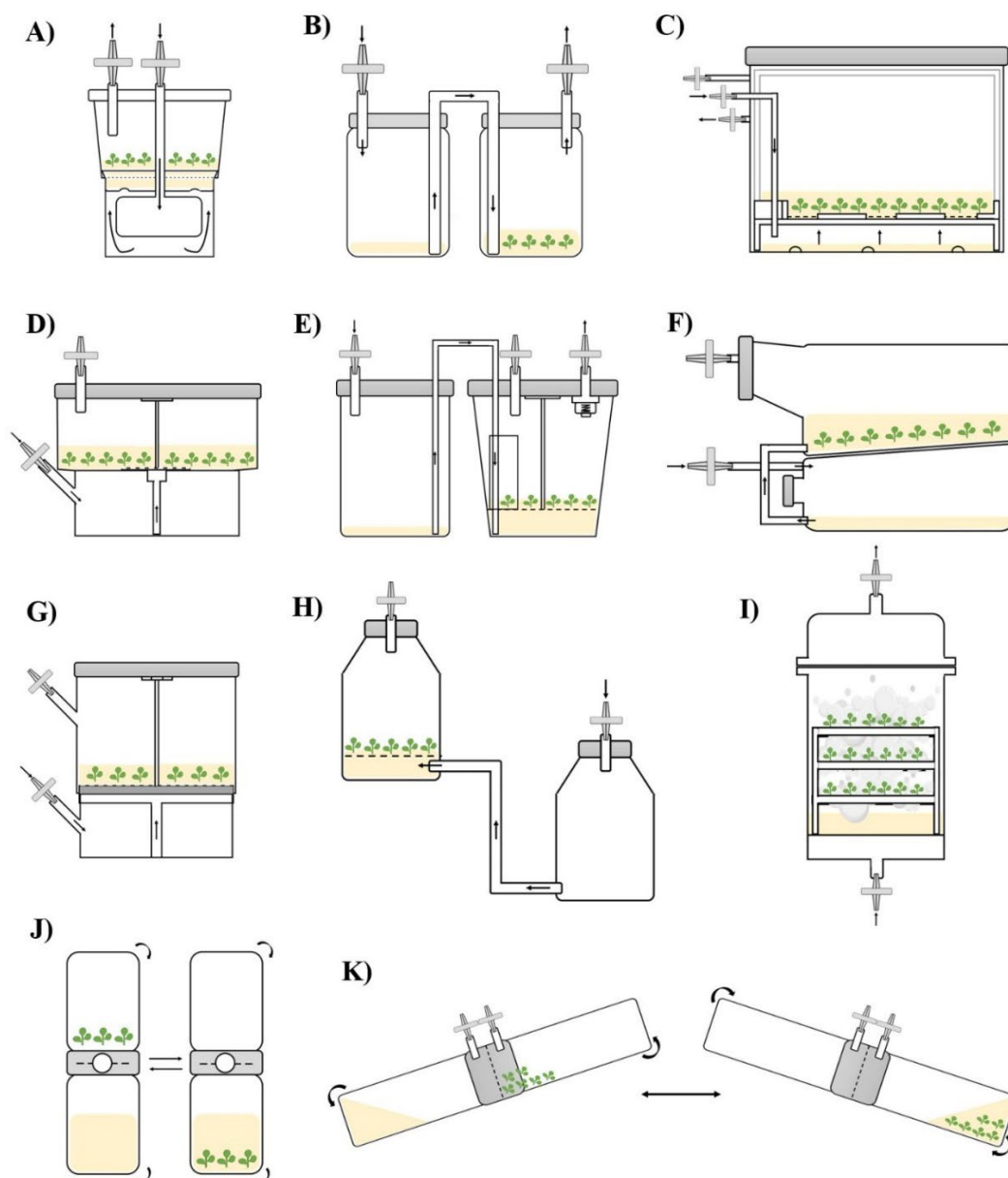


Figura 1. Modelos de biorreactores de inmersión temporal:

- A) RITA[®]. B) Twin-flask. C) PLANTFORM[™]. D) MATIS[®]. E) RALM.
F) SETIS[™]. G) PLANTIMA[®]. H) Biorreactor de flujo y reflujo. I) Biorreactor de inmersión por burbujas (BIB). J) BioCoupler[™]. K) BioMINT[™].

Nota: Elaboración propia

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1 Material Vegetal

- a. Plantas de *Rubus idaeus* (frambuesa) variedad Heritage.

1.2. Material de Laboratorio

- b. Beaker de 100, 200 y 500 ml.
- c. Espátula.
- d. Microespátula.
- e. Matraz de 200 y 500 ml.
- f. Pipetas de 2, 5 y 10 ml.
- g. Pipeta Pasteur.
- h. Placas Petri.
- i. Probetas de 100, 500 y 1000 ml.
- j. Tubos de ensayo 25 x 150 mm.

1.3. Equipos de Laboratorio

- Autoclave vertical (HUXLEY HL-340 C/SA4).
- Balanza analítica (KERN ABJ-NM/ABS-N).
- Cámara de flujo laminar (C4 FLH 180).
- Potenciómetro (HANNA HI 2213).

1.4. Reactivos

- 6-bencilaminopurina (BAP).
- Ácido giberélico (GA₃).
- Ácido indol-3-acético (AIA).
- Ácido indol-3-butírico (IBA).
- Ácido naftalenacético (ANA).
- Ácido clorhídrico (HCl).
- Agua destilada.
- Etanol 70% y 96%.
- Hidróxido de sodio (NaOH).
- Hipoclorito de sodio (NaClO).
- Medio Murashige Skoog (MS) + vitaminas (Phytotechnology).
- Phytigel.
- Sacarosa.
- Tween 20.

1.5. Otros

- Bisturí.
- Bolsas de polipropileno y polietileno.
- Bombas de aire de 2.5 W.
- Conectores de manguera.
- Frascos de 400 ml y 700 ml.
- Goma espuma 22 kg/m³.
- Gradillas.
- Mangueras de silicona.
- Papel aluminio.
- Papel milimetrado.
- Pinzas.
- Plastic wrap.
- Recipientes Magenta GA7.
- Tapers de polipropileno.
- Temporizadores.
- Tijeras.
- Tubo LED T5 FSL 3000K (luz cálida).
- Silicona.

2. Métodos

2.1. Lugar de ejecución

Este trabajo de investigación fue realizado en los laboratorios del pabellón H de la Universidad Católica de Santa María de Arequipa.

2.2. Establecimiento *in vitro*

2.2.1. Material vegetal

Se utilizaron segmentos nodales como explantes obtenidos de plantines jóvenes menores a un 1 año de edad de *Rubus idaeus* (frambuesa) variedad Heritage, provenientes de la empresa “Nutriarandanos” y conservadas en un miniinvernadero en Arequipa. Además, se emplearon plantas *in vitro* de *Rubus idaeus* (frambuesa) variedad Heritage de la empresa “SK Viveros”.

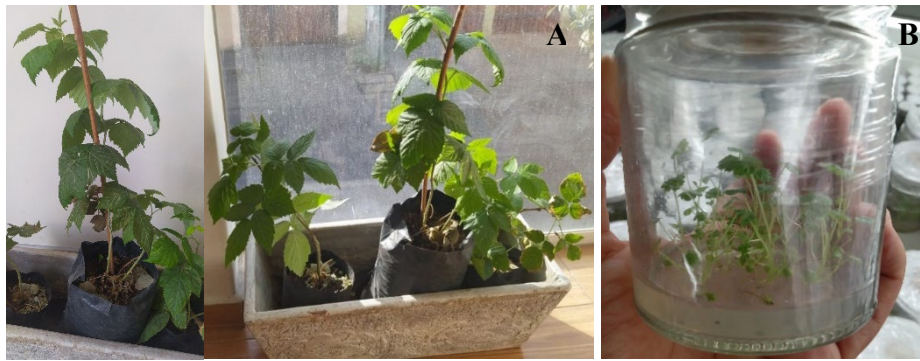


Figura 2. Material vegetal. A) Planta madre de *Rubus idaeus* (frambuesa).
B) Plantas *in vitro* de frambuesa.

2.2.2. Evaluación de métodos de desinfección

Se seleccionaron tallos con buena cantidad de segmentos nodales de las plantas madre, los cuales fueron cortados con una tijera previamente desinfectada con etanol 70%, y se almacenaron los explantes en bolsas de plástico con papel humedecido para su transporte a laboratorio. Los explantes se trataron con una pre-desinfección que consistió en el cortado de hojas, seguido de un lavado con agua, un lavado con agua jabonosa y tres enjuagues en agua potable, para luego ser cortados en segmentos nodales de 3 cm aproximadamente.



Figura 3. Pre-tratamiento del material vegetal. A) Transporte del material vegetal. B) Explantes seleccionados. C) Poda de hojas de los explantes. D) Lavado en agua jabonosa.

La desinfección se realizó mediante un lavado de etanol 70% por 2 minutos de los explantes, luego se sometieron a 4 tratamientos: dos de ellos fueron con hipoclorito de sodio (NaClO) al 2.5% por 10 y 15 minutos (T1 y T2 respectivamente), mientras que en los otros tratamientos se utilizó NaClO al 2.5% con Tween 20 al 0.1% por 10 y 15 minutos (T3 y T4 respectivamente) como se observa en la Tabla 4. Terminado los tiempos de exposición, se realizaron 3 enjuagues en agua destilada estéril por intervalos de 5 minutos para eliminar los residuos de desinfectante.

Tabla 4. Tratamientos de desinfección utilizados

Tratamiento	Desinfectante	Tiempo de exposición (min.)
T1	NaClO 2.5%	10
T2	NaClO 2.5%	15
T3	NaClO 2.5% + Tween 20	10
T4	NaClO 2.5% + Tween 20	15

Nota: min. = minutos

Finalizado los tratamientos de desinfección, en la cámara de flujo laminar se cortaron los extremos de cada uno de los explantes obteniendo segmentos nodales de aproximadamente 1.5 cm. Luego éstos fueron introducirlos en tubos de ensayo de 25x150 mm conteniendo 10 ml de medio MS suplementado con 1 mg/L de BAP y 30 g/L de sacarosa a pH 5.7 y gelificado con phytigel a 3.5 g/L. Se cultivaron 5 segmentos nodales por tratamiento y se mantuvo en un fotoperiodo de 16/8 horas de luz y oscuridad por 4 semanas a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ aproximadamente.

La evaluación se realizó visualmente cada semana considerando la contaminación que pueda existir, la oxidación o fenolización y a la cuarta semana se evaluó el tamaño del brote, el número de hojas y la viabilidad de explantes mediante la siguiente ecuación:

Ecuación 1. Viabilidad de explantes

$$Viabilidad = \frac{\text{Número de explantes vivos sin contaminación}}{\text{Número de explantes totales}} \times 100$$



Figura 4. Establecimiento *in vitro* de *Rubus idaeus* (frambuesa). A) Lavado de explantes en NaClO + Tween 20. B) Explantes enjuagados. C) Corte de segmentos nodales. D) Segmento nodal sembrado en tubo de ensayo.

2.3. Diseño y construcción de un biorreactor de inmersión temporal

Para el diseño y construcción del biorreactor del presente trabajo se tomó en cuenta el modelo del biorreactor SETIS™. El biorreactor de inmersión temporal está conformado por dos recipientes colocados uno sobre el otro. El recipiente inferior es de polipropileno donde se contiene el medio de cultivo líquido, mientras que el recipiente superior es de policarbonato, el cual contiene los explantes a micropropagar. Ambos recipientes tienen dos conectores de bronce, el cual uno sirve para unir ambos recipientes mediante una manguera de silicona y el otro para la entrada y salida de aire. Además, las mangueras tienen un filtro de goma espuma de 3 cm de largo con 1.5 cm de diámetro.

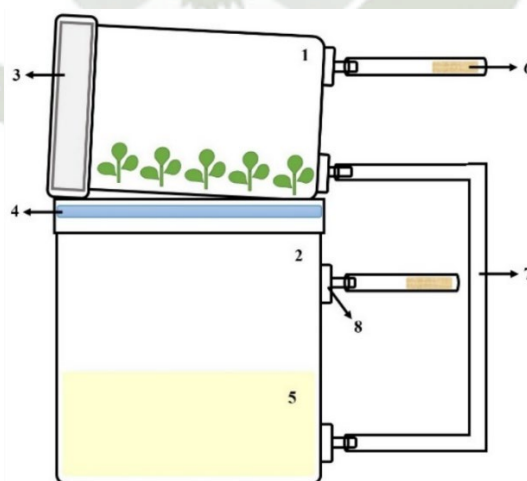


Figura 5. Diseño del biorreactor: 1) Contenedor de cultivo. 2) Contenedor de medio. 3) Empaque de teflón. 4) Empaque de silicona. 5) Medio de cultivo. 6) Filtro de aire. 7) Manguera de silicona. 8) Conector de bronce.

Nota: Elaboración propia

2.4. Determinación de la frecuencia y tiempo de inmersión óptimos en un biorreactor para la multiplicación de *Rubus idaeus*

Cada biorreactor contuvo 250 ml de medio MS suplementado con reguladores BAP Y GA₃ a 1 y 0.5 mg/L respectivamente a pH 5.7, además de 30 g/L de sacarosa. Se configuraron las bombas de aire y temporizadores con las frecuencias 2, 3 y 4 veces por día con 3, 4 y 5 minutos de inmersión, cuyas combinaciones se observan en la Tabla 5. El cultivo se mantuvo a un fotoperiodo de 16/8 horas de luz y oscuridad a $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ aproximadamente, por 2 semanas, donde cada biorreactor contenía 5 vitroplantas de 1 cm de longitud

Tabla 5. Tratamientos para la evaluación de tiempo y frecuencia de inmersión del biorreactor.

Tratamiento	Frecuencia de inmersión (veces/día)	Tiempo de inmersión (min.)
B1	2	3
B2	3	3
B3	4	3
B4	2	4
B5	3	4
B6	4	4
B7	2	5
B8	3	5
B9	4	5

Nota: min. = minutos

Además, se evaluó la longitud de las vitroplantas con papel milimetrado, el número de brotes y se calculó el coeficiente de multiplicación (CM) mediante la siguiente ecuación.

Ecuación 2. Coeficiente de multiplicación

$$CM = \frac{\text{Número de brotes finales}}{\text{Número de brotes iniciales}}$$

2.5. Evaluación del efecto de las auxinas en el enraizamiento *in vitro* de *Rubus idaeus*

Se colocaron las vitroplantas propagadas de la metodología anterior con sales del medio MS reducidas a la mitad ($\frac{1}{2}$ MS) en diferentes concentraciones de auxinas en frascos de vidrio y tubos de ensayo, donde cada frasco contenía 5 vitroplantas. Se utilizó $\frac{1}{2}$ MS sin regulador como control (T1); suplementados con auxina AIA a concentración 1.0 y 1.5 mg/L (T2 y T3); IBA a 0.2, 0.5 y 1.0 mg/L (T4, T5 y T6); y ANA a 0.5, 1.0 y 1.5 mg/L (T7, T8 y T9) como se observa en la Tabla 6, a pH 5.7 y gelificado con 3.5 g/L de phytigel. Las vitroplantas se cultivaron bajo fotoperiodo de 16/8 horas de luz y oscuridad a $23 \pm 2^\circ\text{C}$ aproximadamente por 6 semanas. Se evaluó el número de raíces desarrolladas y la longitud de raíces de las vitroplantas con papel milimetrado.

Tabla 6. Tratamientos para la evaluación de concentración de auxinas.

Tratamiento	Concentración de auxina
T1	Ninguno (Control)
T2	AIA 1.0 mg/L
T3	AIA 1.5 mg/L
T4	IBA 0.2 mg/L
T5	IBA 0.5 mg/L
T6	IBA 1.0 mg/L
T7	ANA 0.5 mg/L
T8	ANA 1.0 mg/L
T9	ANA 1.5 mg/L

2.6. Evaluación del efecto de la concentración de sacarosa en la micropropagación

2.6.1 Evaluación del efecto de la concentración de sacarosa en fase de multiplicación

Multiplicación *in vitro*

Se utilizaron vitroplantas de frambuesa y se colocaron en frascos de vidrio con medio MS suplementado con 1 mg/L de BAP y 0.5 mg/L de GA₃ a dos concentraciones de sacarosa:

15 y 30 g/L (M1 y M2 respectivamente) a pH 5.7 y 3.5 g de phytigel en condiciones de fotoperiodo de 16/8 horas de luz y oscuridad a $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ aproximadamente. Cada frasco contenía 5 vitroplantas para cada tratamiento y el efecto de la sacarosa fue evaluado a las 4 semanas tomando en cuenta el tamaño de los brotes y el número de brotes.

Multiplicación en biorreactor

Para la evaluación del efecto de la sacarosa en la multiplicación de frambuesas usando biorreactores se colocaron 5 vitroplantas en un biorreactor bajo régimen de 4 minutos de inmersión por 3 veces al día, que fue el resultado óptimo al evaluar las frecuencias y tiempos de inmersión. El medio utilizado fue MS suplementado con 1mg/L de BAP y 0.5 mg/L de GA₃ a dos concentraciones de sacarosa: 15 y 30 g/L (M3 y M4 respectivamente) a pH 5.7 con fotoperiodo de 16/8 horas de luz y oscuridad a $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ aproximadamente. Luego se evaluaron el tamaño de los brotes y el número de brotes después de 2 semanas.

Tabla 7. Tratamientos de concentración de sacarosa para multiplicación de brotes.

Tratamiento	Ambiente	Concentración de sacarosa (g/L)
M1	<i>In vitro</i>	15
M2	<i>In vitro</i>	30
M3	Biorreactor	15
M4	Biorreactor	30

2.6.2. Evaluación del efecto de la concentración de sacarosa en fase de enraizamiento

Se utilizaron vitroplantas de frambuesa colocándolas en tubos de ensayo y frascos de vidrio utilizando las mismas concentraciones de auxinas evaluadas anteriormente (Tabla 6), pero a dos concentraciones de sacarosa: 15 y 30 g/L, como se observa en la Tabla 8. Las vitroplantas se mantuvieron en condiciones de fotoperiodo de 16/8 horas de luz y oscuridad a $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ aproximadamente durante 6 semanas. Cada frasco contenía 5 vitroplantas para cada tratamiento. Posteriormente se evaluaron el número de raíces producidas y longitud de raíces con papel milimetrado.

Tabla 8. Tratamientos de concentración de sacarosa para enraizamiento *in vitro*.

Tratamiento	Medio	Concentración de sacarosa (g/L)
E1	½ MS	30
E2	½ MS	15
E3	1.0 mg/L AIA	30
E4	1.0 mg/L AIA	15
E5	1.5 mg/L AIA	30
E6	1.5 mg/L AIA	15
E7	0.2 mg/L IBA	30
E8	0.2 mg/L IBA	15
E9	0.5 mg/L IBA	30
E10	0.5 mg/L IBA	15
E11	1.0 mg/L IBA	30
E12	1.0 mg/L IBA	15
E13	0.5 mg/L ANA	30
E14	0.5 mg/L ANA	15
E15	1.0 mg/L ANA	30
E16	1.0 mg/L ANA	15
E17	1.5 mg/L ANA	30
E18	1.5 mg/L ANA	15

2.7. Comparación de la eficiencia de multiplicación *in vitro* frente al cultivo en biorreactor

Se utilizaron los mejores resultados obtenidos de la fase de multiplicación de frambuesa para evaluar la eficiencia del proceso *in vitro* frente al uso de biorreactores como se muestra en la Tabla 9. Los datos para evaluar la eficiencia de la fase de multiplicación fueron longitud y coeficiente de multiplicación (CM).

Tabla 9. Comparación de la eficiencia de multiplicación *in vitro* vs biorreactor.

Tratamiento	Medio	Ambiente
T1	MS + BAP + GA ₃	<i>In vitro</i>
T4	MS + BAP + GA ₃	Biorreactor

3. Diagrama de flujo de actividades

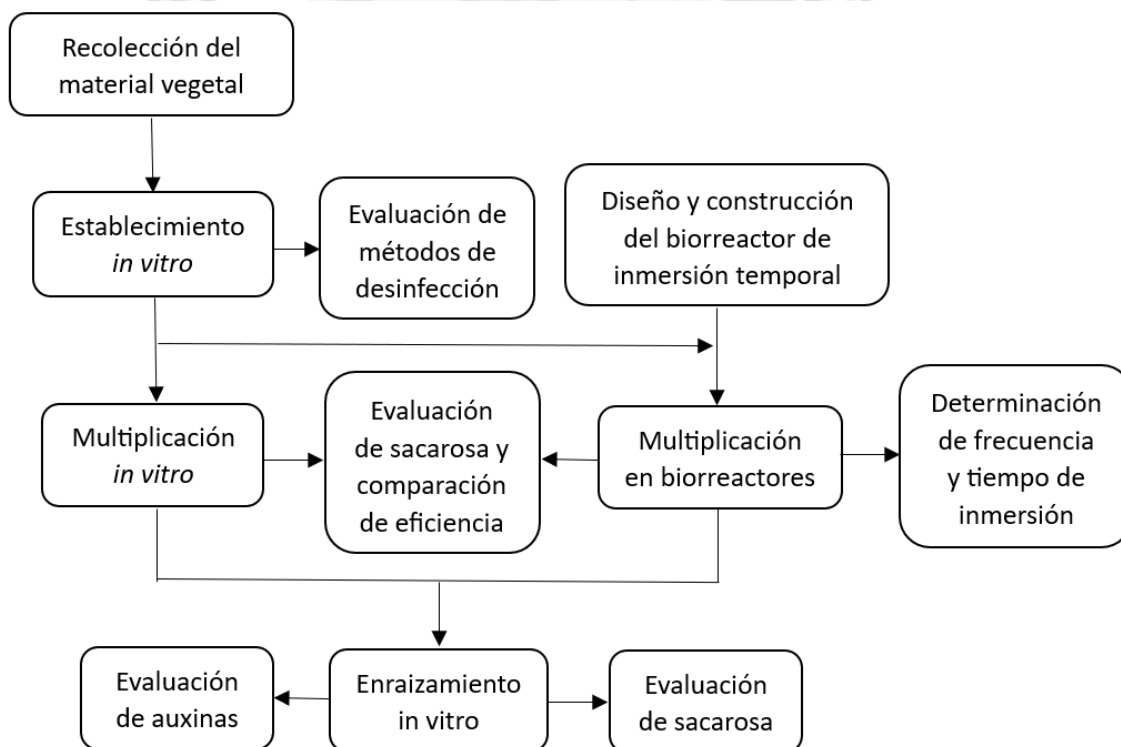


Figura 6. Diagrama de flujo de las actividades.

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Establecimiento *in vitro*

1.1. Evaluación de desinfección de explantes

Se realizaron 4 tratamientos para el establecimiento *in vitro*, donde se evaluó el efecto de desinfección del hipoclorito de sodio y Tween 20 en diferentes tiempos de exposición con los explantes (Tabla 4).

Para el establecimiento *in vitro* de frambuesa variedad Heritage se tomaron como explantes los segmentos nodales de las primocañas de las plantas madre por una mayor facilidad de manejo frente a meristemas. Además, Villazon Camacho ^[53] determinó que las yemas axilares (segmentos nodales) son mejores explantes (49.3% de regeneración) en comparación con hojas y ápices caulinares (meristemo apical) para el establecimiento *in vitro* del género *Rubus*. El tamaño de los explantes fue de 1.5 cm, ya que un menor tamaño generaría efectos adversos a la regeneración como indican Dziejdzic et al. ^[54]

En la Tabla 10 se muestran los resultados obtenidos aplicando los 4 tratamientos a diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio y Tween 20 en diferentes tiempos de exposición.

Tabla 10. Porcentaje de segmentos nodales de frambuesa no contaminados y contaminados tras 4 semanas de los tratamientos de desinfección.

Tratamientos	% Explantes no contaminados			% Explantes contaminados		
	Explantes viables	Explantes oxidados	Total	Bacterias	Hongos	Total
T1	0	40	40%	60	0	60%
T2	40	40	80%	20	0	20%
T3	40	20	60%	40	0	40%
T4	60	20	80%	20	0	20%

Como se puede observar en la Tabla 10 y la Figura 7, la menor viabilidad se presentó en el tratamiento 1 (T1), mientras que la mayor viabilidad se obtuvo utilizando un lavado en alcohol al 70% por 2 minutos, seguido de un lavado en NaClO al 2.5% con Tween 20 al 0.1% durante 15 minutos (T4). A la primera semana de cultivo, los explantes del tratamiento 4 mostraron la presencia de brotes axilares en su totalidad, pero tras la segunda semana de cultivo se oxidó uno de los explantes y otro presentó contaminación. Tras 4 semanas el tratamiento 4 resultó en una viabilidad del 60%.

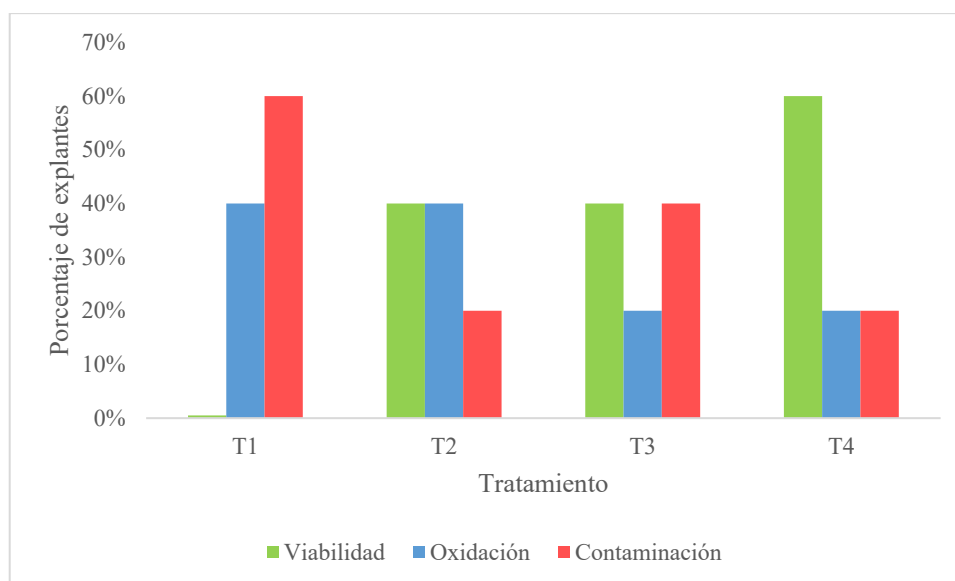


Figura 7. Efecto de los tratamientos de desinfección en el porcentaje de explantes viables, oxidados y contaminados.

La menor contaminación presentada fue en los tratamientos 2 y 4, resultando en un 20% de contaminación. Por otro lado, la mayor contaminación se presentó en el tratamiento 1 en un 60%. Hubo presencia de contaminación bacteriana, pero ninguna del tipo fúngica. La contaminación presentada en los tratamientos se podía evidenciar tras la primera semana de cultivo, pero hubo casos en los que se presentaba tras la segunda y tercera semana. La contaminación predominante fue la de una bacteria con coloración amarilla y capacidad fermentativa anaeróbica.

La oxidación es uno de los mayores problemas al micropropagar frambuesas. El pardeamiento, necrosis y muerte de los explantes es causado por la exudación y oxidación de compuestos fenólicos, lo que resulta en la formación de quinonas que son altamente reactivas y tóxicas para los tejidos vegetales ^[55]. La menor oxidación se evidenció en los tratamientos 3 y 4 con un 20%, mientras que los tratamientos 1 y 2 presentaron 40% de oxidación. La oxidación se mostraba con el ennegrecimiento del explante, y en algunos casos los fenoles del explante se expandieron al medio de cultivo resultando en una coloración ligeramente café.

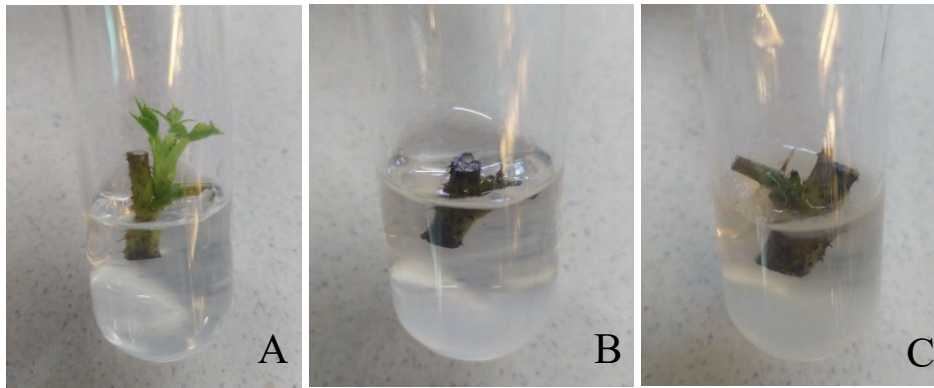


Figura 8. Explantes de frambuesa tras una semana de cultivo. A) Explante viable. B) Explante oxidado. C) Explante contaminado.

Comúnmente se utiliza un medio de cultivo sin reguladores para el establecimiento *in vitro*, pero en este caso se realizó con la adición de 1 mg/L de BAP. La adición de este regulador dio como resultado un crecimiento acelerado en todos los tratamientos, lo que hacía posible continuar con un subcultivo a partir de las 2 semanas de introducción *in vitro*. Además, crecieron brotes axilares de los explantes con un promedio de 2.83 brotes por explante, siendo 4 el máximo y 1 brote como mínimo. Hunkova et al. ^[56] suplementaron el medio de iniciación con 0.5 mg/L de BAP y 0.2 mg/L de IBA; Poothong et al. ^[57] utilizaron también los mismos reguladores, pero a concentración de 1 mg/L BAP con 0.01 mg/L IBA; y Amalia et al. ^[55] emplearon 0.6 mg/L de BAP, 0.5 mg/L de gluconato de calcio y 1 g/L de ácido ascórbico reportando la presencia de 2 a 3 brotes en el medio de iniciación similar a lo obtenido en el presente trabajo de investigación.

Al finalizar el tiempo de 4 semanas de cultivo *in vitro*, los segmentos nodales de frambuesa variedad Heritage dieron la formación de brotes vigorosos con una altura de 1 hasta 3.5 cm como se puede observar en la Figura 9.



Figura 9. Brotes de *Rubus idaeus* (frambuesa) variedad Heritage tras 4 semanas de introducción *in vitro*.

Los mejores resultados obtenidos en la desinfección de explantes de frambuesa variedad Heritage fue de 60% de viabilidad, 20% de oxidación y 20% de contaminación bacteriana utilizando un lavado de 70% de etanol por 2 minutos, seguido de un lavado en Hipoclorito de sodio (NaClO) al 2.5% con Tween 20 al 0.1% durante 15 minutos.

Existen reportes cuya desinfección fue en base a lavados de alcohol y NaClO como el de Hoepfner et al. ^[58] que utilizó una desinfección con 70% de etanol por 2 minutos seguido de 10% de NaClO por 12 minutos. Snir ^[59] solo utilizó isopropanol al 80% por 30 minutos en 5 variedades de frambuesa incluyendo la variedad Heritage. Stoevska et al. ^[19] utilizaron en su establecimiento una desinfección con alcohol 70% por 10-30 segundos seguido de un lavado en NaClO al 10% por 10 minutos, pero con la adición de una solución de sublimado al 0.1% en variedades Samodiva y Shopska Alena.

Otros autores emplearon la adición de un surfactante a la desinfección de explantes siendo el más usado Tween 20. Wu J et al. ^[60] realizaron una desinfección con 0.6% de NaClO con 2 gotas de Tween 20 por 25 minutos; Arencibia et al. ^[15] desinfectaron con 10% NaClO y 0.1% Tween 20 por 15 min; Amalia et al. ^[55] utilizó NaClO 1% con gotas de Tween 20 por 15 minutos con las variedades Allgold, Erika y Polka; Poothong ^[57] desinfectó con 10% NaClO más Tween 20 por 10 minutos en la variedad Amity; y Debnath S. ^[61] 0.63% de NaClO con Tween 20 al 0.1% por 15 minutos reportando un 10% de contaminación y presencia de oxidación en algunos explantes. Se optó evaluar la viabilidad del uso de este

surfactante debido a su presencia en la mayoría de investigaciones obteniendo la mejor viabilidad (60%) con su empleo.

Otros autores utilizaron en vez de NaClO otro agente desinfectante como el cloruro de mercurio (HgCl_2). Hunkova et al. ^[56] realizaron una desinfección 6 minutos de HgCl_2 al 0.1% con gotas de Tween 20 en variedades Tulameen y Black Jewell reportando presencia de necrosis en los explantes; Villazon Camacho ^[53] desinfectó explantes de frambuesa roja con 1% de HgCl_2 por 10 minutos reportando 22.77% de contaminación y 59.44% de oxidación con una viabilidad baja del 17.79%; Allecaco J. ^[9] reportó un 70% de viabilidad sin contaminación, pero con 30% de oxidación empleando HgCl_2 al 0.1% por 10 minutos, sin embargo, tuvo la misma viabilidad utilizando NaClO al 2.5% por 15 minutos. En el presente trabajo se omitió el uso de HgCl_2 por su alta toxicidad y requerimiento de un mayor número de enjuagues para remover el desinfectante como indican los autores.

Los antibióticos y fungicidas también son una opción a utilizar para la desinfección de los explantes como reportaron Hunkova et al. ^[56] al utilizar Cefotaxima (150 mg/L) para eliminar exitosamente los problemas de contaminación que tuvo; Jones Castro et al. ^[62] utilizaron 6 g/L de Agri-mycin® y bisolex® con 5 g/L de Ferbam® por 60 minutos en bomba al vacío, sin embargo, obtuvo 51.67% de contaminación fúngica con 45% de viabilidad. Los autores explican que la ineficiencia del tratamiento con fungicidas fue producida por la resistencia generada al tratar las plantas madre con el mismo tratamiento.

2. Diseño y construcción de un biorreactor de inmersión temporal

Para el diseño y construcción del biorreactor se tomó como referencia el modelo del biorreactor SETISTM en modo de operación de flujo y reflujo, y en régimen discontinuo (Batch). El biorreactor está conformado por dos recipientes colocados uno sobre otro (Anexo 17). El recipiente inferior de 700 ml es de polipropileno, donde contiene el medio de cultivo líquido; mientras que el recipiente superior de 350 ml es de policarbonato, modificado de un contenedor Magenta, que contiene el material vegetal. Ambos recipientes tienen dos conectores, de los cuales uno sirve para unir ambos recipientes mediante una manguera de silicona y el otro es para la entrada y salida de aire.

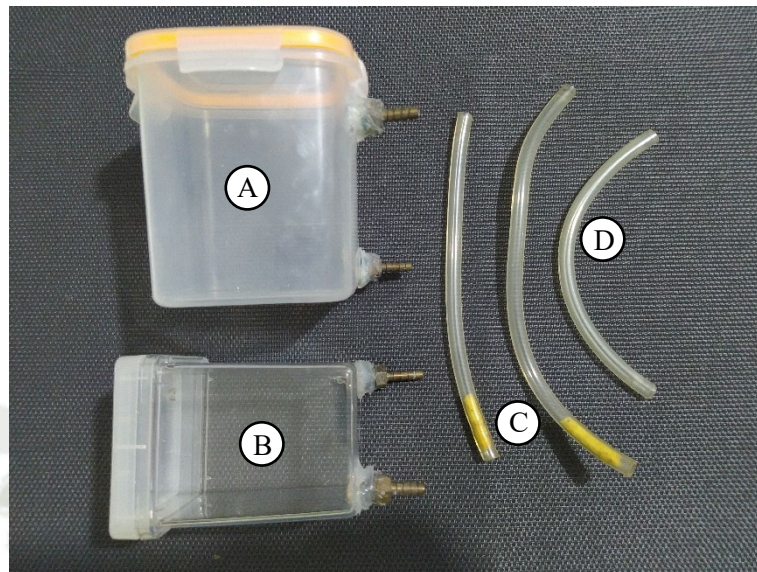


Figura 10. Partes del biorreactor. A) Contenedor de medio de cultivo. B) Contenedor de material vegetal. C) Mangueras con filtro de goma espuma. D) Manguera de conexión entre contenedores.

El biorreactor debe permanecer hermético para mantener un ambiente libre de contaminantes y puedan desarrollarse solo las vitroplantas. El aire de entrada debe ser estéril y se suelen usar filtros de microporos de 2 μm . Para este trabajo, las mangueras por donde circula aire contienen un filtro de goma espuma de $22\text{kg}/\text{m}^3$, cuyas dimensiones son de $1.5 \times 1.5 \times 3 \text{ cm}$ que fueron introducidos a presión, similares a los usados por Calisaya et al. ^[63], como se observa en la Figura 11.

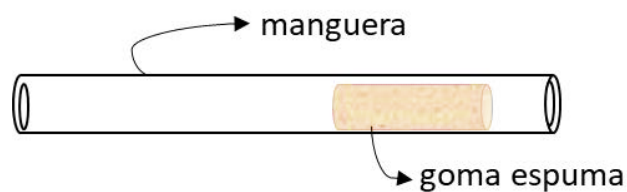


Figura 11. Diseño del filtro de aire a base de espuma.

Nota: Elaboración propia

Estos filtros de goma espuma mantienen un ambiente estéril dentro del biorreactor. Además, el aire es administrado por dos bombas de aire de pecera de 2.5 W que están conectadas a temporizadores que controlan su funcionamiento para establecer los tiempos y frecuencias

de inmersión. Calisaya et al. ^[63] optaron por utilizar filtros de goma espuma, ya que presenciaron contaminación con filtros de aire a los 7 días, y reportan que estos filtros soportan la potencia de las bombas de aire utilizadas en el presente trabajo, además de tener un menor costo.

Los materiales utilizados en el biorreactor son resistentes a la temperatura de esterilización por autoclave (121°C). La diferencia del material en ambos recipientes es porque el policarbonato es más transparente permitiendo un mejor paso de luz y una mejor visualización de los explantes. Las bombas tienen la potencia suficiente para bombear hasta 3L/min de aire. El biorreactor contenía 250 ml de medio líquido en su respectivo contenedor, el cual es suficiente para alcanzar a llenar la mitad del otro contenedor en estado de inmersión asegurando el contacto del medio con el material vegetal.

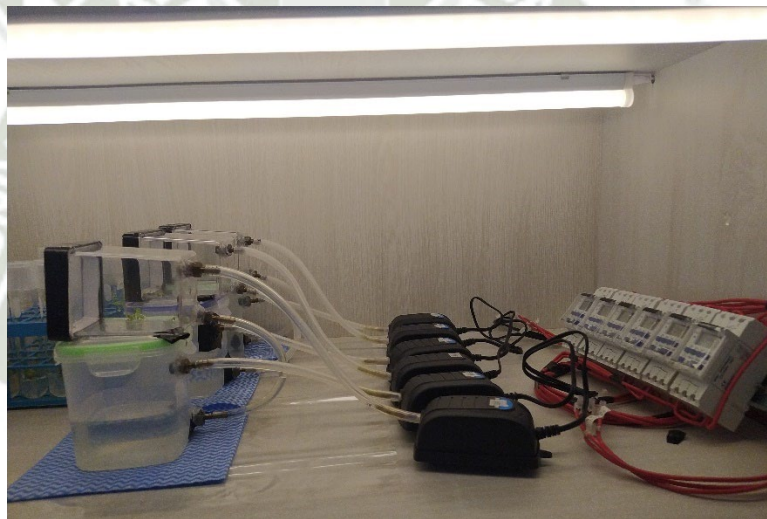


Figura 12. Biorreactores en funcionamiento con sus respectivas bombas de aire y temporizadores.

2.1. Funcionamiento del biorreactor

El modo de operación del biorreactor, como se observa en la Figura 13, inicia con un periodo estacionario, donde el material vegetal está expuesto y desprovisto de medio de cultivo. Este periodo es seguido por el ingreso de aire impulsado por una bomba hacia el contenedor de medio, pasando por un filtro para mantener el interior estéril. El aire ingresado empuja, por presión, al medio líquido a través de una manguera hacia el contenedor de cultivo generando un contacto del medio con el material vegetal (distribución del medio). El medio de cultivo se mantiene en este contenedor por el tiempo que se designe (tiempo de inmersión). Después

inicia el drenado con el ingreso de aire a través de otra manguera impulsado por otra bomba hacia el contenedor de cultivo. El nuevo aire ingresado empuja al medio de cultivo al contenedor inferior, generando su retorno y terminando el ciclo de una inmersión temporal para retornar al periodo estacionario. Esto se repite el número de veces designado.

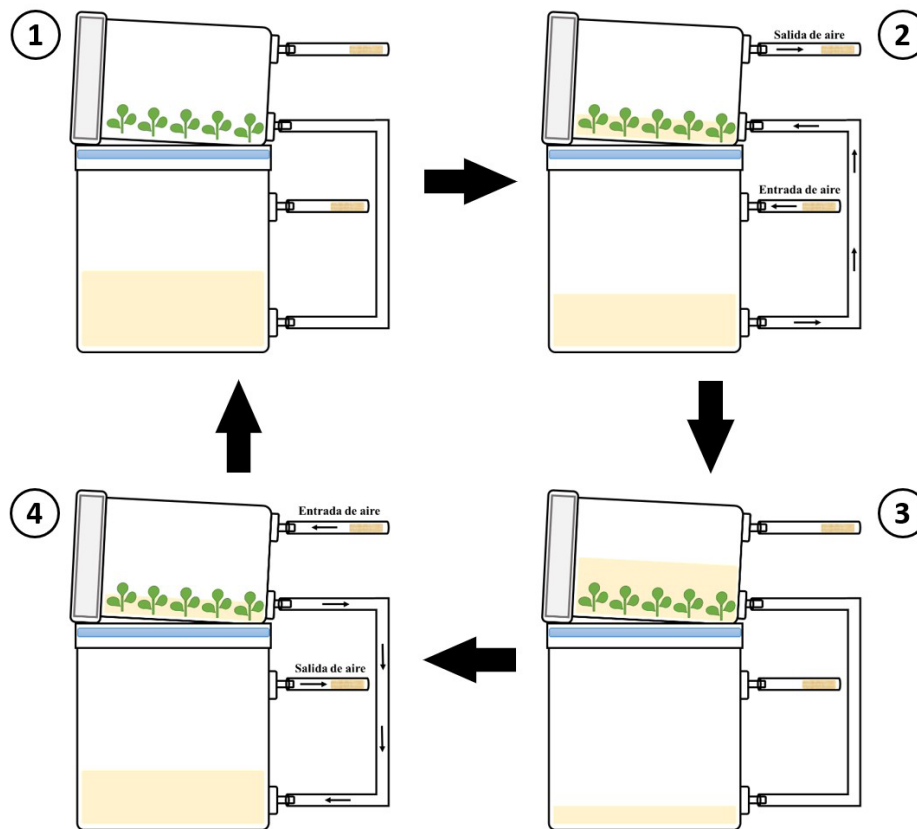


Figura 13. Diseño operativo del biorreactor. 1) Periodo estacionario. 2) Distribución del medio líquido. 3) Tiempo de inmersión. 4) Drenado de medio.

Nota: Elaboración propia

3. Determinación de la frecuencia y tiempo de inmersión óptimos en un biorreactor para la multiplicación de *Rubus idaeus*

Se colocaron 5 vitroplantas de frambuesa *Rubus idaeus* variedad Heritage provenientes del establecimiento y una multiplicación *in vitro* convencional. En esta etapa se hizo la comparación de combinaciones de 3 tiempos de inmersión: 3, 4 y 5 minutos; con 3 frecuencias de inmersión: 2, 3 y 4 veces de inmersión al día; originando 9 combinaciones.

Además, cada vitroplanta introducida al biorreactor era de 1 cm de altura con un mínimo de 3 hojas.

La inmersión se lograba a los 10 segundos de activarse la bomba de aire que inyecta aire al contenedor del medio de cultivo. El tiempo de inmersión culminaba al drenarse todo el medio del contenedor del material vegetal por la inyección de aire de una segunda bomba.

De acuerdo al diseño descrito por Lotfi et al. ^[52] para un biorreactor SETISTM, se puede configurar para realizar aireaciones independientes a las inmersiones. Sin embargo, para este trabajo se empleó una aireación de 30 segundos después de cada inmersión realizada mediante el continuo funcionamiento de la bomba después de terminada la fase de drenaje del medio.

3.1. Evaluación de la longitud de los explantes desarrollados en biorreactor

Para la evaluación de la longitud de los explantes se analizaron los promedios de cada uno de las combinaciones de frecuencia y tiempo de inmersión aplicadas. La media más alta lograda fue de 1.56 cm de altura en los brotes con la configuración de 3 minutos de inmersión por 2 veces al día (cada 12 horas). Mientras que la menor altura promedio alcanzada fue de 0.94 cm con un tiempo de inmersión de 3 min por 3 veces al día. Sin embargo, las 9 configuraciones evaluadas no tuvieron una diferencia significativa (Prueba de Kruskal-Wallis, $p=0.697$) (Anexo 1).

Tabla 11. Media de alturas de brotes de cada configuración de frecuencia y tiempo de inmersión.

Tiempo de inmersión (min)	Frecuencia de inmersión		
	2	3	4
3	1.56 cm	0.94 cm	1.21 cm
4	0.98 cm	1.06 cm	1.15 cm
5	1.00 cm	1.16 cm	1.13 cm

En la Figura 14 se puede observar la comparación de las 9 configuraciones de tiempo y frecuencias de inmersión con relación a la altura media desarrollada por los brotes en el biorreactor. La altura media más alta se consiguió con 2 frecuencias de inmersión, pero conforme se aumentaba el tiempo de inmersión, esta altura disminuía; lo mismo ocurrió con una frecuencia de 4 veces al día. Por otro lado, a una frecuencia de inmersión de 3 veces al día, la altura media iba aumentando conforme se aumentaba el tiempo de inmersión. Además

en la mayoría de las configuraciones la altura media rondaba en 1 cm de longitud, el cual es una altura aceptable para continuar con subcultivos de multiplicación.

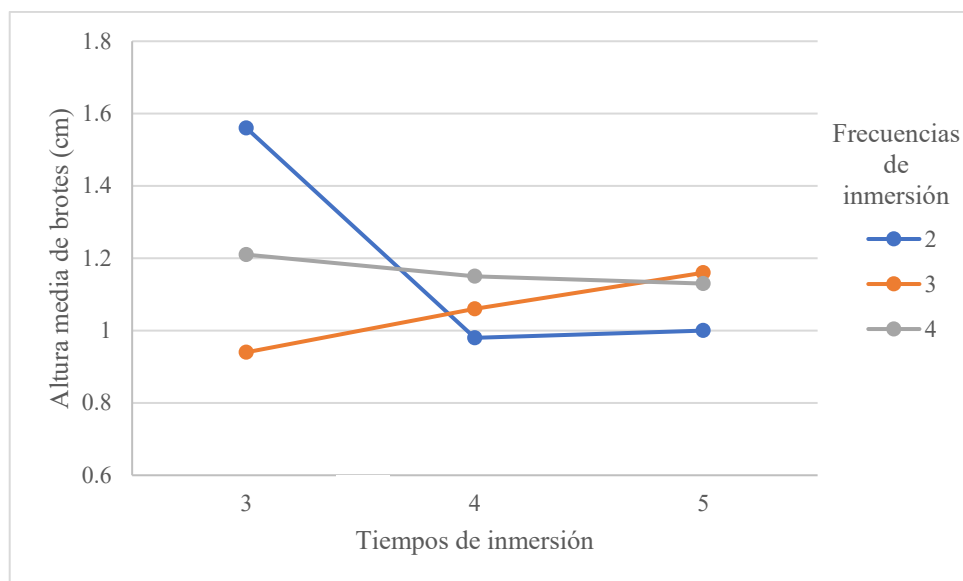


Figura 14. Comparación de tiempos y frecuencias de inmersión para la altura de brotes obtenidos en multiplicación por biorreactor.

Los resultados, en cuanto a longitud de brotes, obtenidos en la multiplicación de frambuesa variedad Heritage fueron bajos en comparación a los reportados por otros autores como Arencibia et al. ^[15], que obtuvieron una altura media de 5.97 cm en biorreactores Twin Flask con un medio suplementado con 1 mg/L BAP y 0.3 mg/L de IBA bajo régimen de 3 minutos de inmersión 3 veces al día. Sin embargo, su cultivo en biorreactor empleó aireaciones enriquecidas con CO₂ y su periodo de cultivo fue el doble (30 días). Por otro lado, Debnath S. ^[61] logró una altura media de 3.4 cm en biorreactores RITA® con régimen de 15 minutos de inmersión 6 veces al día con un medio suplementado con 1 mg/L de BAP por 8 semanas.

En otras variedades de frambuesa como Himbo Top®, híbrida suiza entre Autumn Bliss con Himbo Queen, se reportó una altura de 3.87 cm en biorreactor SETIS™ 3 minutos 4 veces al día con una aireación de 2 minutos 8 veces al día (cada 3 horas) en medio MS modificado con 0.8 mg/L BAP y 0.01 mg/L IBA cambiando la fuente de hierro a FeEDDHA ^[64,65]. Clapa et al. ^[66] trabajaron con las variedades Willamette y Maravilla logrando unas alturas entre 2.5 y 3.2 cm en biorreactor Plantform™ a 1 minuto de inmersión cada 4 horas (6 veces al día) con una aireación de 4 minutos cada hora y un medio de cultivo MS con 0.5 mg/L de BAP.

3.2. Evaluación del número de brotes y coeficiente de multiplicación de los explantes desarrollados en biorreactor

Otro aspecto que se evaluó para determinar la frecuencia y tiempo de inmersión óptima en el uso de biorreactor para la multiplicación de vitroplantas de frambuesa fue el número de brotes desarrollados por explante. La configuración que presentó el número mayor de brotes fue la de 4 minutos de inmersión por 3 veces al día (cada 8 horas), donde se empezó con 5 brotes y se obtuvo un total de 18 brotes con una media de 3.6 brotes por explante. Sin embargo, las 9 configuraciones evaluadas no tuvieron una diferencia significativa (Prueba de Kruskal-Wallis, $p=0.525$) (Anexo 2).

Tabla 12. Coeficiente de multiplicación de número de brotes de cada configuración de frecuencia y tiempo de inmersión.

Tiempo de inmersión (min)	Frecuencia de inmersión		
	2	3	4
3	1.6	2.4	2
4	2.6	3.6	3.4
5	2.2	2.8	2.2

El coeficiente de multiplicación (CM) se halló mediante la Ecuación 2. El mayor CM logrado fue con la configuración de 4 minutos de inmersión por 3 veces al día, el cual fue de 3.6. El valor del CM es el aspecto más importante en la multiplicación, ya que determina la eficiencia en el proceso de obtener un gran número de plantas.

En la Figura 15 se puede observar la comparación de las 9 configuraciones de tiempo y frecuencias de inmersión con relación al CM desarrollado por los brotes en el biorreactor. En todas las frecuencias se aprecia un mayor CM cuando se trabajaba con 4 minutos de inmersión y además, una frecuencia de 3 veces al día de inmersión tiene un mejor CM en cualquiera de los tiempos de inmersión. El menor coeficiente de multiplicación resultó de un tiempo de inmersión de 3 minutos cada 12 horas (2 veces al día), que pudo deberse a que los brotes tuvieron menor contacto con el medio a diferencia de las demás configuraciones.

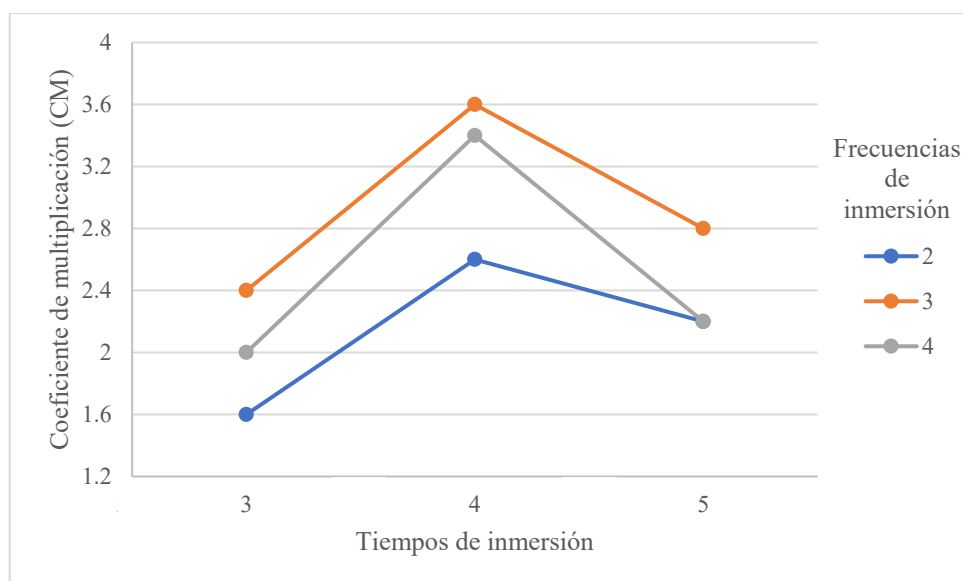


Figura 15. Comparación de tiempos y frecuencias de inmersión para CM de brotes obtenidos en multiplicación por biorreactor.

Los resultados obtenidos en cuanto al número de brotes por explante o CM al multiplicar frambuesa roja Heritage en biorreactor fueron similares a los de otros autores que trabajaron con la misma variedad como Arencibia et al. ^[15], que obtuvieron 3.61 brotes por explante; y Debnath S. ^[61] con un CM de 1.7. La configuración óptima lograda en este trabajo presentó una multiplicación aceptable frente a estos estudios en un menor tiempo de cultivo (2 semanas).

La respuesta de los brotes de frambuesa depende mucho del genotipo utilizado, esto dificulta su micropropagación ^[67,68], por eso se debe realizar pruebas para cada variedad a multiplicar. Diferentes autores tomaron esto en cuenta, por lo que existen varias investigaciones para cada variedad como Polka realizada por Georgieva et al. ^[69] logrando un CM de 6.7 en biorreactor RITA® a 20 minutos 1 vez al día por 4 semanas. Welander M. ^[70] utilizó la variedad Mormoshalon en biorreactor Plantform™ bajo régimen de 6 minutos de inmersión 2 veces al día con una aireación de 4 minutos cada hora obteniendo 3.45 de CM. Clapa et al. ^[66] multiplicaron las variedades Maravilla y Willamette logrando un CM de 4.01 y 9.52 respectivamente en biorreactor Plantform™. Por último, Jones Castro et al. ^[62] obtuvieron 1.6 brotes por explante en biorreactor RITA® con una inmersión de 2 minutos 2 veces al día por 4 semanas.

También se observó un patrón al evaluar los tiempos y frecuencias de inmersión. Si se alcanzaba un CM alto, la altura de los brotes era baja en comparación a la situación inversa donde si se alcanzaba una altura mayor, su CM disminuía. Esta relación inversamente proporcional entre altura y CM no se ha descrito como tal en otras investigaciones, pero también se logra observar al analizar los resultados de diferentes investigaciones.

4. Evaluación del efecto de las auxinas en el enraizamiento *in vitro* de *Rubus idaeus*

En esta etapa se evaluaron las auxinas AIA, IBA y ANA a diferentes concentraciones. De 1 y 1.5 mg/L para AIA (T2 y T3); 0.2, 0.5 y 1 mg/L para IBA (T4, T5 y T6); 0.5, 1, 1.5 mg/L para ANA (T7, T8 y T9); y un control sin la adición de regulador (T1) en medio MS reducido a la mitad ($\frac{1}{2}$ MS). Además, se utilizaron brotes con un mínimo de longitud de 2cm para enraizar, ya que producen mayor número de raíz y soportan mejor las condiciones de estrés en la aclimatación ^[54].

A las 6 semanas de cultivo *in vitro*, los brotes cultivados con IBA (T4, T5 y T6) presentaron formación de raíz, pero con desarrollo de callos. Los brotes no presentaron muerte o necrosis, pero debido a la formación adicional de callos, se tomaron como sin respuesta. Los brotes tratados con ANA a 1 y 1.5 mg/L (T8 y T9) también presentaron formación de raíz, pero con desarrollo de callos, por lo que tampoco se consideraron como respuesta favorable.

La formación de callos en la base de las vitroplantas puede obstruir la conexión entre los brotes y las raíces que están por desarrollarse. Además, hay una correlación negativa entre la calogénesis (formación de callos) y la supervivencia de las plantas durante su aclimatación, por eso es necesario que un protocolo de enraizamiento minimice o elimine la formación de callos ^[71,72].

El éxito de enraizamiento se puede cuantificar en base a la presencia de raíces por tratamiento, la gran mayoría de autores reportan esta eficiencia en base al porcentaje de enraizamiento. En la Figura 16 se puede observar el porcentaje de enraizamiento según el tratamiento, donde los tratamientos T1(Control) y T7 (0.5 mg/L ANA) tuvieron el 100% de enraizamiento. Los tratamientos T4, T8 y T9 presentaron formación de raíces, pero con presencia de callos basales.

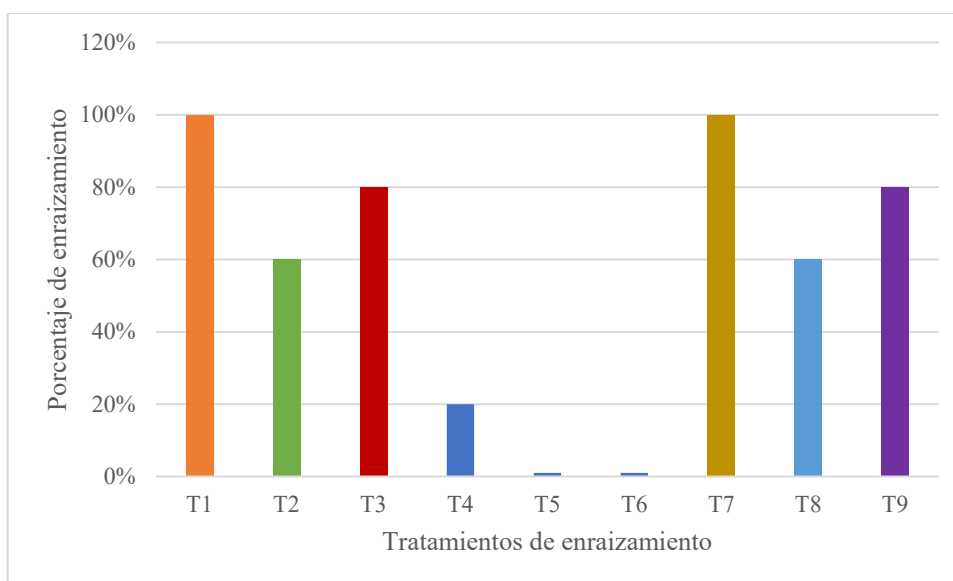


Figura 16. Porcentaje de enraizamiento por cada tratamiento utilizado.

Se realizó una prueba ANOVA, y se puede afirmar que los tratamientos son diferentes a un 95% de nivel de confianza (ANOVA por Tukey, $p=0.00009$) (Anexo 3) para número de raíces y para su longitud (ANOVA por Tukey, $p=0.000002$) (Anexo 4). El tratamiento que alcanzó una mayor media de formación de raíces fue el T3 (1.5 mg/L de AIA), siendo 4.2 raíces por brote. Además, la longitud media máxima de raíces alcanzada fue de 3.19 cm por el tratamiento con 0.5 mg/L de ANA (T7).

Tabla 13. Media de longitud y número de raíces desarrollados por cada tratamiento de enraizamiento.

Tratamiento	Nº de raíces	Longitud de raíz (cm)
T1 ½ MS (Control)	3.80 _{ab}	2.58 _a
T2 1 mg/L AIA	3.40 _{ab}	1.49 _{ab}
T3 1.5 mg/L AIA	4.20 _a	0.54 _b
T4 0.2 mg/L IBA	0.00 _b	0.00 _b
T5 0.5 mg/L IBA	0.00 _b	0.00 _b
T6 1 mg/L IBA	0.00 _b	0.00 _b
T7 0.5 mg/L ANA	4.00 _a	3.19 _a
T8 1 mg/L ANA	0.00 _b	0.00 _b
T9 1.5 mg/L ANA	0.00 _b	0.00 _b

Subíndices a, b, ab pertenecientes a prueba Tukey

Como se observa en la Tabla 13, el mayor número de raíces fue el tratamiento 3, mientras que la mayor longitud de raíz se logró en el tratamiento 7. Sin embargo, no hay mucha diferencia entre los tratamientos 3 y 7 en cuanto a número de raíces, por lo tanto, se puede

considerar al T7 como el tratamiento óptimo para el enraizamiento de *Rubus idaeus* (frambuesa) variedad Heritage. Por otro lado, el uso del medio $\frac{1}{2}$ MS sin reguladores (control) presentó una longitud y número de raíces aceptables; por lo que se puede considerar este tratamiento como parte de un protocolo comercial para reducir costos de producción.

Los tratamientos T4, T5, T6, T8 y T9 presentaron calogénesis, por lo que se consideraron respuestas negativas. Mezzetti et al. ^[73] explican que para desarrollar una organogénesis específica se puede controlar con reguladores de crecimiento en una relación entre citoquininas y auxinas. Mientras la concentración de citoquininas sea mayor, promoverá la formación de brotes adventicios; y si la concentración de auxinas es mayor puede promover el desarrollo de callos o rizogénesis ^[73]. Para el caso de frambuesa variedad Heritage las auxinas IBA y ANA a concentraciones mayores de 0.5 mg/L producen formación de callos basales. Leitzke et al. ^[74] obtuvieron resultados similares al trabajar con IBA y reportaron que en concentraciones mayores a 0.6 mg/L induce la formación de callos en la variedad Heritage.

Los mejores tratamientos logrados para enraizamiento *in vitro* de frambuesa roja Heritage fueron T1 y T7, control y 0.5 mg/L de ANA respectivamente, con un 100% de enraizamiento. Estos datos son similares con los logrados por Allcaco J. ^[9], que alcanzó un 70% con una media de 3.5 raíces por brote y 0.5 cm de longitud a los 30 días de cultivo con 1 mg/L de AIA. Debnath S. ^[61] logró un 86% de enraizamiento en un medio de cultivo sin reguladores. Por último, Snir I. ^[59] enraizó solo 10% con 1 a 2 mg/L de IBA en su medio de cultivo por más de 2 meses.

En otras variedades como Allgold, Erika y Polka también se reportó la formación de callos a un 95% al utilizar IBA ^[55]; Mezzetti et al. ^[73] reportaron que el uso de IBA y ANA produce callos en periodos largos de cultivo (más de 45 días) con la variedad Autumn Bliss. Sin embargo, otros autores tuvieron éxito al enraizar con IBA como Stoevska et al. ^[19], logrando entre 93.3 al 100% entre 0.51-3.05 cm de longitud en las variedades Shopska Alena y Samodiva con una concentración de 0.5 mg/L, sin embargo, a concentraciones mayores de 2 mg/L reporta la presencia de callos basales. Georgieva et al. ^[75] reportaron 80.5% de enraizamiento con una concentración de 0.2 mg/L IBA en variedad Samodiva, pero en variedad Magdalena se obtuvo un 26.5% de enraizamiento. Hunkova et al. ^[56] alcanzaron 80-100% de enraizamiento a 1 mg/L de IBA en variedades Black Jewell y Tulameen. Sabooni et al. ^[76] determinaron que usar IBA a 1.91 mg/L es más eficiente que utilizar ANA

para enraizar *Rubus* spp. Villazon Camacho ^[53] obtuvo 80.8% de enraizamiento con una media de 1.74 cm de longitud a 1 mg/L de IBA en frambuesa roja. Por último, Wu J et al. ^[60] indicaron hasta 85% de enraizamiento a concentraciones entre 0.3 a 0.5 mg/L de IBA en frambuesas con 1/5 de medio MT (Mursashige y Tucker, 1969). Por otro lado, Kim C. et al. ^[77] reportaron un mejor resultado, 75-100% de enraizamiento con 2.2 raíces por explante, con ANA 1.86 mg/L y 3.72 mg/L para las variedades Joan J. y Polana respectivamente, sin embargo, también reportaron buenos resultados en un medio sin auxinas.

El proceso de enraizamiento es muy costoso, 35-75% del costo, y algunos laboratorios suelen eliminar esta fase al juntarla con la aclimatación denominándolo enraizamiento *ex vitro* ^[78]. Existen algunos reportes de enraizamiento *ex vitro* como el de Arencibia et al. ^[15], cuyo enraizamiento fue con sustrato de corteza de pino y zeolita. Zhang et al. ^[79] reportaron el uso de un enraizante comercial TakeRoot® (IBA), consiguiendo una formación de raíces desde la segunda semana de cultivo con un 100% de aclimatación, sin embargo, tuvo que realizar una fase extra de elongación post multiplicación para alcanzar una altura de 2 cm o más en los brotes. Lebedev et al. ^[78] determinaron un enraizamiento entre 43 a 76% en 7 variedades rusas; y Hoepfner et al. ^[58] lograron entre 62 a 97% de enraizamiento utilizando turba en variedades noruegas.

5. Evaluación del efecto de la concentración de sacarosa en la micropropagación

Las plantas derivadas del cultivo *in vitro* no son capaces inicialmente de producir su propia materia orgánica mediante la fotosíntesis al permanecer en un ambiente cerrado, por lo tanto, necesitan un periodo de transición durante la aclimatación ^[80]. Debido a esto, la finalidad de la adición de azúcar al medio es la de tener una fuente de carbono que la planta normalmente fija de la atmósfera mediante la fotosíntesis ^[26].

La concentración óptima de sacarosa requerida varía según la especie de la planta. Para el caso de frambuesa existen pocos estudios que se centraron en este tema ^[57,81]. Por ello, el presente trabajo evaluó el efecto de la disminución de la concentración de sacarosa de 30 g/L a 15 g/L en las fases de multiplicación y enraizamiento.

5.1. Evaluación del efecto de la concentración de la sacarosa en la fase de multiplicación

Para la fase de multiplicación en frambuesa variedad Heritage se realizaron cultivos *in vitro* a 15 y 30 g/L de sacarosa en frascos de vidrio con una densidad de 5 brotes por frasco durante 4 semanas. El medio utilizado fue MS suplementado con 1 mg/L de BAP y 0.5 mg/L de GA₃. Además, se realizó un cultivo en biorreactor con el mismo medio de cultivo, pero a 15 g/L de sacarosa, bajo el mejor régimen obtenido de la experimentación previa (4 minutos de inmersión, 3 veces al día) durante 2 semanas.

Tabla 14. Alturas de brotes y Coeficientes de Multiplicación (CM) alcanzados según tratamientos de concentración de sacarosa.

Ambiente	Sacarosa (g/L)	Altura de brote (cm)	CM
<i>In vitro</i>	30	0.88	3.0
	15	0.83	2.2
Biorreactor	30	1.06	3.6
	15	1.32	5.8

El cambio de la concentración de la sacarosa en la multiplicación *in vitro* no tuvo diferencia significativa para la altura y número de brotes (ANOVA, $p=0.747$, $p=0.475$ respectivamente) (Anexo 5 y 6). Sin embargo, las plantas cultivadas a 15 g/L de sacarosa presentaron un CM y altura media de brotes menor que a 30 g/L de sacarosa como se muestra en la Tabla 14.

Los resultados obtenidos concuerdan con la investigación de Poonthong et al. ^[57]. Redujeron la concentración de sacarosa a 0, 10 y 15 g/L determinando que no hay mucha diferencia al reducir la concentración alcanzando un CM de hasta 2.8 y una altura entre 0.7 y 0.9 cm en la variedad Amity. Sin embargo, también investigó su efecto en un medio MS modificado aumentando las sales meso y micronutrientes a una doble concentración logrando un CM de 5.8 utilizando 15 g/L de sacarosa. A pesar de que no exista una diferencia significativa entre las concentraciones de sacarosa, para la multiplicación *in vitro* en variedad Heritage es recomendable mantener la concentración de 30 g/L por mantener una multiplicación aceptable.

En cuanto a la multiplicación en biorreactor, la disminución de la concentración de sacarosa tuvo una diferencia estadísticamente significativa (ANOVA, $p=0.034$) (Anexo 7) para el coeficiente de multiplicación, el cual fue 5.8. Sin embargo, para la altura media de brotes no

tuvo diferencia significativa (ANOVA, $p=0.07$) (Anexo 8). A pesar de ello, también se puede observar un ligero incremento de altura en 1.32 cm.

Los resultados para la multiplicación en biorreactor de frambuesa variedad Heritage fueron superiores a los obtenidos por Arencibia et al. [15], ya que obtuvieron un CM de 3.85 al disminuir la concentración de sacarosa a 15 g/L frente a un CM de 3.61 en 30 g/L. En contraste, el presente trabajo si tuvo una mayor diferencia en el CM debido a que se optimizaron los tiempos y frecuencias de inmersión.

Aunque el trabajo de Arencibia et al. [15] no tuvo mucha diferencia al multiplicar con reducción de la sacarosa, reportan un mejor aspecto de los brotes debido a una mayor eficiencia en su capacidad fotosintética. Este mejor aspecto también se encuentra presente en la multiplicación en biorreactor realizada en frambuesa variedad Heritage para este trabajo.

5.2. Evaluación del efecto de la concentración de la sacarosa en la fase de enraizamiento

Para la evaluación de la concentración de sacarosa en el enraizamiento de frambuesa variedad Heritage se realizaron cultivos *in vitro* con 15 g/L de sacarosa en medio MS reducido a la mitad con los mismos reguladores evaluados anteriormente (AIA, IBA y ANA) en las mismas concentraciones, además del cultivo control sin reguladores.

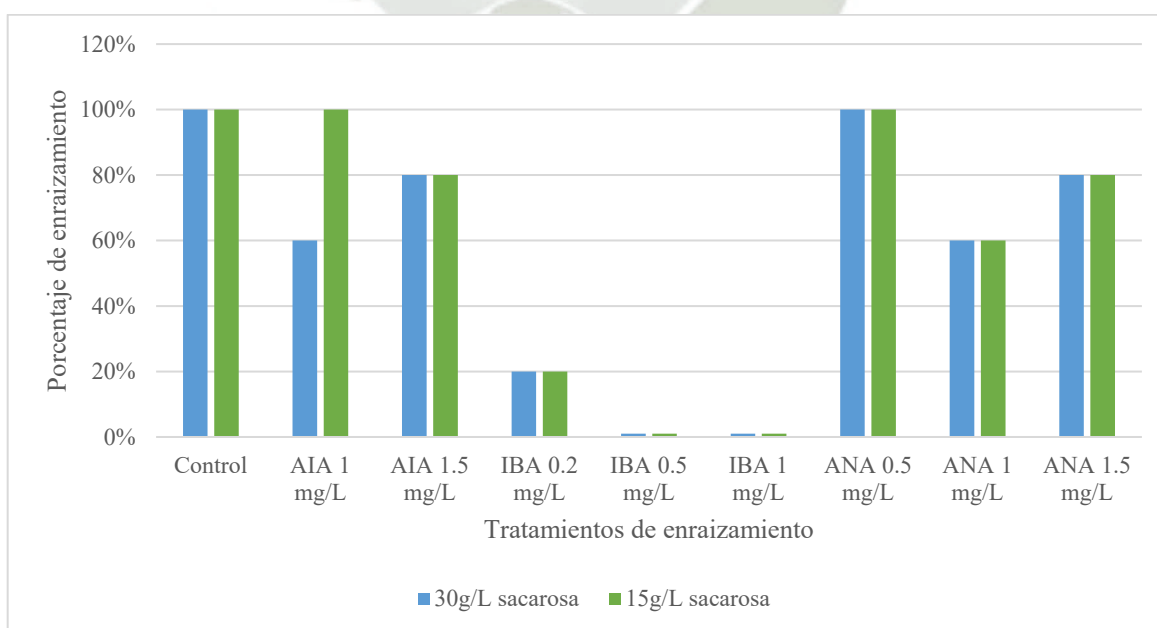


Figura 17. Comparación de los porcentajes de enraizamiento según los tratamientos utilizados a 15 y 30 g/L de sacarosa.

El porcentaje de enraizamiento no varió con el cambio de la concentración de sacarosa en el medio, con excepción del tratamiento con la adición de 1 mg/L de AIA donde muestra un incremento de 60% hasta 100% de enraizamiento como se observa en la Figura 17.

Los resultados obtenidos en la Tabla 15 muestran que al disminuir la concentración de sacarosa a 15 g/L y la adición de un 1mg/L de AIA alcanza una media de 4.2 raíces por explante y un mayor porcentaje de enraizamiento (Figura 17) indicando un efecto positivo a la reducción de la concentración de sacarosa. En la evaluación estadística se muestra que existe diferencia significativa entre concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo de enraizamiento (ANOVA, $p=0.035$) (Anexo 9).

En relación a la longitud de raíces también se muestra un efecto positivo en el medio con 1 mg/L de AIA alcanzando una media de 2.12 cm al reducir la concentración de sacarosa a la mitad (Tabla 15). Estos datos corroboran con el análisis estadístico que indica diferencia significativa entre las dos concentraciones de sacarosa (ANOVA, $P=0.03$) (Anexo 10).

Tabla 15. Número de raíces y longitud media según la concentración de sacarosa y auxina utilizada en el medio de enraizamiento.

Auxina	Sacarosa (g/L)	Nº de raíces	Longitud de raíz (cm)
Control	30	3.8	2.58
	15	1.6	1.89
AIA 1mg/L	30	3.4	1.49
	15	4.2	2.12
AIA 1.5mg/L	30	4.2	0.54
	15	3.0	0.71
IBA 0.2mg/L	30	-	-
	15	-	-
IBA 0.5mg/L	30	-	-
	15	-	-
IBA 1mg/L	30	-	-
	15	-	-
ANA 0.5mg/L	30	4.0	3.19
	15	-	-
ANA 1mg/L	30	-	-
	15	-	-
ANA 1.5mg/L	30	-	-
	15	-	-

La reducción de la concentración de sacarosa a la mitad (15 mg/L) en el medio para enraizar frambuesa variedad Heritage muestra un efecto negativo reduciendo el número y longitud de raíces, e incluso con la formación de callos basales al utilizar 0.5 mg/L de ANA. La única excepción fue al utilizar 1 mg/L de AIA, el cual resultó en un efecto positivo. Este comportamiento depende de la variedad utilizada y puede cambiar entre genotipos [67,68,82].

Existen pocos reportes donde se evalúa la concentración de sacarosa en fase de enraizamiento para frambuesas. Deng et al. [81] indujeron la capacidad fotosintética en la variedad Festival al cultivarlas al reducir la concentración de sacarosa a 20, 10 y 0 g/L en un medio con 0.5 mg/L de IBA e inyecciones de aire enriquecido en CO₂. Al reducir la concentración de sacarosa se logra un ambiente mixotrófico logrando raíces de 7.3 cm y al quitar la sacarosa el ambiente se convierte en autotrófico alcanzando raíces de 3.2 cm. Sin embargo, destacan que en un ambiente autotrófico se forman raíces peludas, y a pesar de tener un menor tamaño, las plantas se adaptan a la aclimatación más rápido que las cultivadas en ambiente mixotrófico [81].

Por otro lado, en un estudio con zarzamora (*Rubus fruticosus*) realizado por Dewir et al. [83] se evaluó la concentración de sacarosa en 0, 15, 30, 45 y 60 mg/L en combinación con tratamientos de luz LED a diferentes longitudes de onda en un medio suplementado con 1 mg/L de IBA. Reportó que concentraciones entre 15 a 60 g/L de sacarosa indujeron 100% de enraizamiento y que un medio sin sacarosa inhibe el desarrollo de raíces; esto indica que la presencia de sacarosa en un medio con auxinas es indispensable para el enraizamiento *in vitro* [83].

6. Comparación de la eficiencia de la multiplicación *in vitro* frente al cultivo en biorreactor

La propagación convencional de frambuesa requiere mucho tiempo y el material vegetal no está libre de virus. La micropropagación permite una rápida multiplicación y libre de virus [6]. Sin embargo, existe una expectativa de poder disponer de mejores sistemas para la propagación de plantas *in vitro* que superen a los convencionales y reducir los costos de producción [84].

Tabla 16. Longitud de brotes y CM de frambuesa variedad Heritage multiplicadas *in vitro* y en biorreactor.

Ambiente	Tiempo de cultivo	CM	Longitud de brotes (cm)
<i>In vitro</i>	4 semanas	3.0	0.88
Biorreactor	2 semanas	5.8	1.32

Se evaluó la eficiencia de multiplicación de frambuesa variedad Heritage en un ambiente *in vitro* frente a un ambiente en biorreactor, donde los parámetros de respuesta fueron CM y longitud de brotes. Se tomaron en cuenta los mejores resultados del cultivo *in vitro* y en biorreactor (4 minutos de inmersión por 3 veces al día) en un medio MS suplementado con 1 mg/L de BAP y 0.5 mg/L de GA₃, donde las concentraciones de sacarosa fueron 30 y 15 g/L respectivamente. Los resultados obtenidos y que se observan en la Tabla 16 demuestran que el cultivo en biorreactor fue superior con CM de 5.8 y una longitud media de brotes de 1.32 cm. Las respuestas para ambos ambientes fueron estadísticamente significativas tanto para CM (ANOVA, $p=0.048$) (Anexo 11) como para la longitud de brotes (ANOVA, $p=0.021$) (Anexo 12).

Existen pocas investigaciones donde se compara la eficiencia de un cultivo *in vitro* frente a biorreactor para frambuesa variedad Heritage. Arencibia et al. ^[15] determinaron una ligera mejora en el CM al utilizar biorreactor Twin Flask alcanzando 3.8 brotes por explante frente a un CM de 3.15 cultivando *in vitro*; pero si logró un mejor desempeño en la elongación de los brotes de hasta 9.21 cm.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo (Tabla 16) demuestran que el cultivo en biorreactor supera al cultivo *in vitro* convencional para *Rubus idaeus* (frambuesa) variedad Heritage. Esta respuesta se contrasta con los datos reportados de cultivo *in vitro* de la misma variedad por otros autores con coeficientes de multiplicación de 3.15 ^[15], 2.5 ^[59], 5.4 ^[9] y 5.3 ^[85]. En cuanto a la altura media de los brotes se logró superar al reportado por Allcaco ^[9] (0.2 cm), pero no al de Arencibia et al. ^[15] (5.78 cm). Además, el tiempo de cultivo en biorreactor se pudo reducir a la mitad (2 semanas) en comparación con el cultivo *in vitro*.

En otras variedades de frambuesa, como Polka, se reportó un CM de 6.7 utilizando biorreactor RITA® frente a un CM de 3.2 en cultivo *in vitro* convencional ^[69]. Clapa et al. ^[66] observaron que al utilizar biorreactor Plantform™ se logra un menor CM frente al cultivo *in vitro* (9.52 y 16.90 respectivamente) en variedad Willamette y Maravilla (4.01 y 5.9).

Welander et al. [51] también utilizaron biorreactor Plantform™, sin embargo, no encontraron diferencias significativas entre usar biorreactor y cultivar *in vitro*, CM de 3.45 y 3.85 respectivamente; aunque reportó rastros de vitrificación con el empleo de biorreactor. Con frambuesa Himbo Top® usando SETIS™ se logró CM de 1.05 con 3.87 cm de altura, valores notablemente menores en comparación al cultivo *in vitro* con un CM de 5.7 y una altura de 3.08 cm [64,65]. Jones Castro [62] no obtuvo diferencia significativa entre el uso del biorreactor RITA® y el cultivo *in vitro*.

Tras dos semanas de cultivo en biorreactor los brotes de frambuesa presentaron una mayor vigorosidad y mejor aspecto de las hojas. Esta característica es corroborada por diversos autores [15,62,64,65,69]. El mejor aspecto de las plantas cultivadas en biorreactor se debe a que existe una mejor distribución de los nutrientes al usar medio líquido [6,64]; y el mayor tamaño de hojas por la acumulación de agua [69]. También se debe a la capacidad fotosintética de las plantas; y existe una relación entre ésta y la concentración de sacarosa en el medio que afecta al vigor de la planta [26]. Un ambiente heterótrofo es aquel donde la fuente de carbono de la planta depende del medio de cultivo (sacarosa); un ambiente mixotrófico induce la capacidad parcial fotosintética en la planta para producir sus propios carbohidratos al reducir la concentración de sacarosa en el medio y proporcionarle una aireación rica en CO₂; y un ambiente autótrofo elimina la fuente de carbono en el medio para inducir la fotosíntesis en las plantas imitando las condiciones *in vivo* [80,81,86,87]. Los resultados y aspecto de las plantas cultivados en biorreactor (Tabla 16 y Figura 18B) fueron gracias a la reducción de la sacarosa en el medio y a las aireaciones suministradas, estableciéndose así un ambiente mixotrófico.

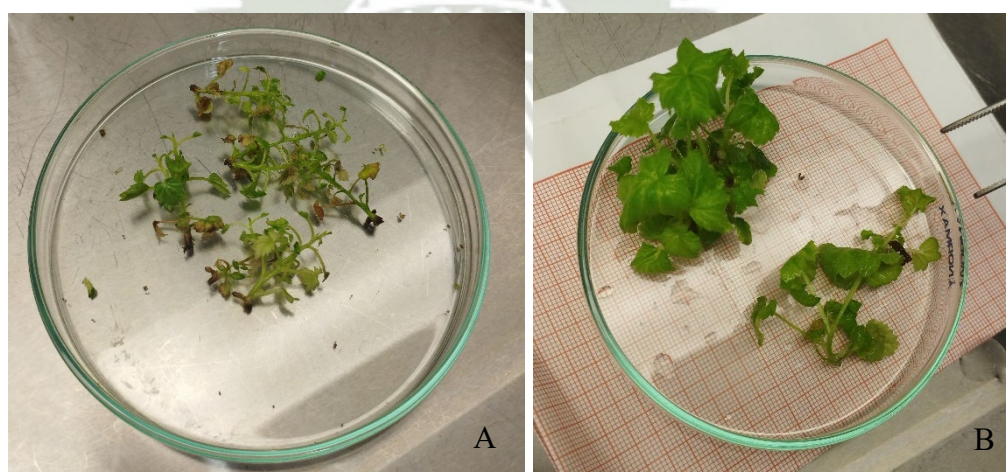


Figura 18. Brotes multiplicados de frambuesa variedad Heritage.

A) Brotes multiplicados *in vitro*. B) Brotes multiplicados en biorreactor.

CONCLUSIONES

1. El tratamiento más adecuado para la desinfección de segmentos nodales como explantes de *Rubus idaeus* (frambuesa) variedad Heritage fue utilizando un lavado de Hipoclorito de sodio (NaClO) al 2.5% con Tween 20 al 0.1% durante 15 minutos logrando un 60% de viabilidad y 2.83 brotes por explante al utilizar medio MS suplementado con 1 mg/L de BAP.
2. Se logró diseñar y construir un biorreactor de inmersión temporal basado en el modelo SETIS™ utilizando un sistema de flujo y reflujo impulsado por bombas de 2.5 W, con aireación estéril gracias a filtros de goma espuma.
3. Se determinó que un tiempo de inmersión de 4 minutos con una frecuencia de 3 veces al día fue el óptimo para multiplicar brotes de *Rubus idaeus* (frambuesa) variedad Heritage, logrando un coeficiente de multiplicación de 3.6 y una longitud media de 1.06 cm.
4. Se estableció que el medio de enraizamiento MS a mitad de concentración (1/2 MS) suplementado con 0.5 mg/L de ANA permite un enraizamiento de 4 raíces por brote de 3.19 cm de longitud media. Además, el uso de la auxina IBA de 0.2 a 1 mg/L indujo a la formación de callos basales en *Rubus idaeus* (frambuesa) variedad Heritage.
5. La reducción de la concentración de sacarosa no tuvo efecto en la fase de multiplicación *in vitro*, sin embargo en la multiplicación por biorreactor si tuvo un efecto positivo alcanzando un coeficiente de multiplicación de 5.8. Mientras que en el enraizamiento *in vitro* se obtuvo un efecto variado, donde a concentración de 1 mg/L de AIA mejoró la formación de raíces hasta 4.2 por brote de 2.12 cm de longitud media, sin embargo, se observó calogénesis basal con 0.5 mg/L de ANA en *Rubus idaeus* (frambuesa) variedad Heritage.
6. Se logró establecer que el cultivo en biorreactor fue superior al cultivo *in vitro* convencional mejorando el coeficiente de multiplicación, altura de brotes y su aspecto al establecerse un ambiente mixotrófico en la fase de multiplicación para *Rubus idaeus* (frambuesa) variedad Heritage.

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda a los investigadores realizar más pruebas de desinfección para aumentar la viabilidad al establecer *in vitro*; y modificar el medio MS en sus sales meso y fuente de hierro, además de otras concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento para aumentar la eficiencia de multiplicación de brotes.
2. Se sugiere a las empresas de micropropagación optimizar el diseño del biorreactor con la adición de válvulas de escape de aire para evitar altas presiones dentro de los contenedores y probar diferentes frecuencias y tiempos de aireación ambiental y/o enriquecidas en CO₂ para el cultivo en biorreactor; además de analizar la viabilidad de la eliminación de la sacarosa en el medio para establecer un ambiente autotrófico en los biorreactores.
3. Se recomienda a los centros de investigación experimentar con combinaciones de luz a diferentes longitudes de onda para establecer el más favorable para el cultivo *in vitro* de frambuesas y evaluar otros métodos de enraizamiento de brotes como en biorreactor o *ex vitro* en frambuesa variedad Heritage.
4. Se sugiere a los productores optar por utilizar plantas obtenidas por cultivo *in vitro* para garantizar un cultivo uniforme y de calidad, además de establecer parcelas piloto para analizar la introducción del cultivo de frambuesa en la región.

REFERENCIAS

1. García Rubio JC, García González de Lena G, Ciordia Ara M. El cultivo del frambueso. Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA); 2014.
2. Graham J, Brennan R. Introduction to the Rubus Genus [Internet]. In: Raspberry. Springer, Cham; 2018. page 1–16. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-99031-6_1
3. Morales C. Frambueso (*Rubus idaeus* L.), morfología y clasificación. Informativo INIA Raihuén [Internet] 2009;34. Available from: <https://biblioteca.inia.cl/handle/20.500.14001/4310>
4. Hancock RD, Petridis A, McDougall GJ. Raspberry Fruit Chemistry in Relation to Fruit Quality and Human Nutrition [Internet]. In: Graham J, Brennan R, editors. Raspberry. Springer, Cham; 2018. page 89–119. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-99031-6_7
5. Seeram NP, Adams LS, Zhang Y, Lee R, Sand D, Scheuller HS, et al. Blackberry, Black Raspberry, Blueberry, Cranberry, Red Raspberry, and Strawberry Extracts Inhibit Growth and Stimulate Apoptosis of Human Cancer Cells In Vitro. *J Agric Food Chem* [Internet] 2006 [cited 2023 May 26];54(25):9329–39. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf061750g>
6. Badjakov I, Georgiev V, Georgieva M, Dincheva I, Vrancheva R, Ivanov I, et al. Bioreactor Technology for In Vitro Berry Plant Cultivation [Internet]. In: Kishan Gopal Ramawat H, Maria Ekiert SG, editors. *Plant Cell and Tissue Differentiation and Secondary Metabolites*. Springer, Cham; 2021. page 383–431. Available from: https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-030-30185-9_18
7. FAOSTAT [Internet]. 2020 [cited 2023 May 26]; Available from: <https://www.fao.org/faostat/es/#search/Frambuesas>
8. Ramírez-Gastón RA. La frambuesa peruana: una oportunidad prometedora. *Ingeniería Industrial* 2007;25:151–62.
9. Allecaco J. Estandarización de un medio de cultivo para la propagación clonal in vitro de *Rubus idaeus* var. Heritage “frambuesa roja” de importancia comercial. 2016;

10. Morales A CG. Manual de manejo agronómico del Frambueso [Internet]. Boletín INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuaria; 2017. Available from: <https://biblioteca.inia.cl/handle/20.500.14001/6701>
11. Manrique R. La frambuesa continúa trazando su presente productivo en el país - Redagícola Perú [Internet]. Red Agrícola2022;24–5. Available from: <https://www.redagricola.com/pe/la-frambuesa-continua-trazando-su-presente-productivo-en-el-pais/>
12. Morales A. CG, González A. MI, Hirzel C. J, Riquelme S. J, Herrera M. G, Madariaga V. M, et al. Aspectos relevantes en la producción de frambuesa (*Rubus idaeus* L.) [Internet]. Boletín INIA - Instituto de investigaciones Agropecuarias; 2009. Available from: <https://biblioteca.inia.cl/handle/20.500.14001/7305>
13. Loyola-Vargas VM, De-La-Peña C, Galaz-Ávalos RM, Quiroz-Figueroa FR. Plant tissue culture [Internet]. In: Walker J, Rapley R, editors. Molecular Biomethods Handbook: Second Edition. Humana Press; 2008. page 875–904. Available from: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-60327-375-6_50
14. Watt MP. The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. Afr J Biotechnol [Internet] 2016 [cited 2023 May 26];11(76):14025–35. Available from: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/129350>
15. Arencibia AD, Vergara C, Quiroz K, Carrasco B, García-Gonzales R. Establishment of photomixotrophic cultures for raspberry micropropagation in Temporary Immersion Bioreactors (TIBs). Sci Hortic 2013;160:49–53.
16. United States Department of Agriculture (USDA). *Rubus idaeus* L. American red raspberry [Internet]. 2014 [cited 2023 May 26]; Available from: <https://plants.sc.egov.usda.gov/home/plantProfile?symbol=RUID>
17. De Michelis A. Manual de producción y elaboración de frambuesa e híbridos orientado a valles cordilleranos patagónicos. Buenos Aires: INTA; 2012.
18. Salinas-Moreno Y, Almaguer-Vargas G, Peña-Varela G, Ríos-Sánchez R. Ácido elágico y perfil de antocianinas en frutos de frambuesa (*Rubus idaeus* L.) con diferente grado de maduración. Chapingo 2009;15(1):97–101.

19. Stoevska T, Trifonova A, Karadocheva D. Micropropagation of Raspberries (*Rubus Idaeus*). *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 1995;9(2–3):27–30.
20. Undurraga D P, Vargas S S. Manual de Frambuesa [Internet]. *Boletín INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias*; 2013 [cited 2023 May 26]. Available from: <https://biblioteca.inia.cl/handle/20.500.14001/7646>
21. Gloria Morales Alcayaga C. Frambueso: consideraciones para un exitoso establecimiento del cultivo [Internet]. *Boletín INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias*; 2020. Available from: <https://biblioteca.inia.cl/handle/20.500.14001/67460>
22. Muratalla-Lúa A. La producción de frambuesa y zarzamora en México. *Agro Productividad* [Internet] 2018;6(5). Available from: <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/475>
23. Parodi M G, Benavides M L. Desarrollo del Cultivo de Berries en Perú - Situación y Perspectivas. In: Fischer G, Miranda D, Magnitskiy S, Balaguera-López HE, Molano Z, editors. *Avances en el cultivo de las berries en el trópico*. Bogotá: Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas; 2021. page 91–101.
24. Agraria.pe. Exportaciones peruanas de frambuesa alcanzan las 5.5 toneladas por US\$ 16.000 en 2022 [Internet]. Available from: <https://agraria.pe/noticias/exportaciones-peruanas-de-frambuesa-alcanzan-las-5-5-tonelad-30730>
25. GESTIÓN N. Sierra Exportadora: El desafío es desarrollar la frambuesa, mora, fresas y berries andinos | ECONOMIA | GESTIÓN [Internet]. 2015; Available from: <https://gestion.pe/economia/sierra-exportadora-desafio-desarrollar-frambuesa-mora-fresas-berries-andinos-104768-noticia/>
26. George EF, Hall MA, Klerk GJ De. *Plant propagation by tissue culture*. 3rd ed. Springer Netherlands; 2008.
27. Bhojwani SS, Dantu PK. *Plant tissue culture: An introductory text*. Springer India; 2013.
28. Thomas B, Murphy DJ, Murray BG, editors. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences. Breeding, Genetics and Biotechnology*. 2nd ed. Academic Press; 2017.

29. Levitus G, Echenique V, Rubinstein C, Hopp E, Mroginski L. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II [Internet]. INTA. Argentina: 2010. Available from: www.argenbio.org
30. Suárez Padrón IE. Cultivo de tejidos vegetales [Internet]. Fondo Editorial Universidad de Córdoba; 2020 [cited 2023 May 26]. Available from: <https://repositorio.unicordoba.edu.co/handle/ucordoba/2553>
31. Prieto E. H, Jordán Z. M, Barrueto C. P, Cordeiro MC. Biotecnología vegetal [Internet]. Prograf Impresores; 2005. Available from: <https://biblioteca.inia.cl/handle/20.500.14001/3688>
32. Kubota C, Chun C, editors. Transplant Production in the 21st Century. 1st ed. Springer Netherlands; 2000.
33. Batista DS, Felipe SHS, Silva TD, de Castro KM, Mamedes-Rodrigues TC, Miranda NA, et al. Light quality in plant tissue culture: does it matter? *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* [Internet] 2018;54(3):195–215. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11627-018-9902-5>
34. Gupta N, Jain V, Rosy Joseph M, Devi S, Joseph RM. A Review on Micropropagation Culture Method. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development* [Internet] 2020;8(1):86–93. Available from: <https://ajprd.com/index.php/journal/article/view/653>
35. Phillips GC, Garda M. Plant tissue culture media and practices: an overview. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* [Internet] 2019;55(3):242–57. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11627-019-09983-5>
36. Abdalla N, El-Ramady H, Seliem MK, El-Mahrouk ME, Taha N, Bayoumi Y, et al. An Academic and Technical Overview on Plant Micropropagation Challenges. *Horticulturae* 2022, Vol 8, Page 677 [Internet] 2022;8(8):677. Available from: <https://www.mdpi.com/2311-7524/8/8/677>
37. Hvoslef-Eide AK, Preil W, editors. Liquid culture systems for in vitro plant propagation. 1st ed. Springer Netherlands; 2005.

38. Georgiev MI, Eibl R, Zhong JJ. Hosting the plant cells in vitro: Recent trends in bioreactors. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet] 2013;97(9):3787–800. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-013-4817-x>
39. Mamun NHA, Egertsdotter U, Aidun CK. Bioreactor technology for clonal propagation of plants and metabolite production. *Front Biol (Beijing)* [Internet] 2015;10(2):177–93. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11515-015-1355-1>
40. Paek KY, Chakrabarty D, Hahn EJ. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult* [Internet] 2005;81(3):287–300. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11240-004-6648-z>
41. Yancheva S, Georgieva L, Badjakov I, Dincheva I, Georgieva M, Georgiev V, et al. Application of bioreactor technology in plant propagation and secondary metabolite production. *Journal of Central European Agriculture* [Internet] 2019 [cited 2023 Jun 3];20(1):321–40. Available from: <https://jcea.agr.hr/en/issues/article/2224>
42. Neumann KH, Kumar A, Imani J. *Plant Cell and Tissue Culture - A Tool in Biotechnology: Basics and Application, Second Edition*. Plant Cell and Tissue Culture - A Tool in Biotechnology: Basics and Application, Second Edition 2020;1–459.
43. Ducos JP, Terrier B, Courtois D. Disposable bioreactors for plant micropropagation and mass plant cell culture. *Adv Biochem Eng Biotechnol* [Internet] 2010;115:89–115. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/10_2008_28
44. Silpa P, Roopa K, Dennis Thomas T. Production of plant secondary metabolites: Current status and future prospects. In: Kumar N, editor. *Biotechnological Approaches for Medicinal and Aromatic Plants: Conservation, Genetic Improvement and Utilization*. Springer Singapore; 2018. page 3–25.
45. Steingroewer J, Bley T, Georgiev V, Ivanov I, Lenk F, Marchev A, et al. Bioprocessing of differentiated plant in vitro systems. *Eng Life Sci* 2013;13(1):26–38.
46. Georgiev V, Schumann A, Pavlov A, Bley T. Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Eng Life Sci* 2014;14(6):607–21.

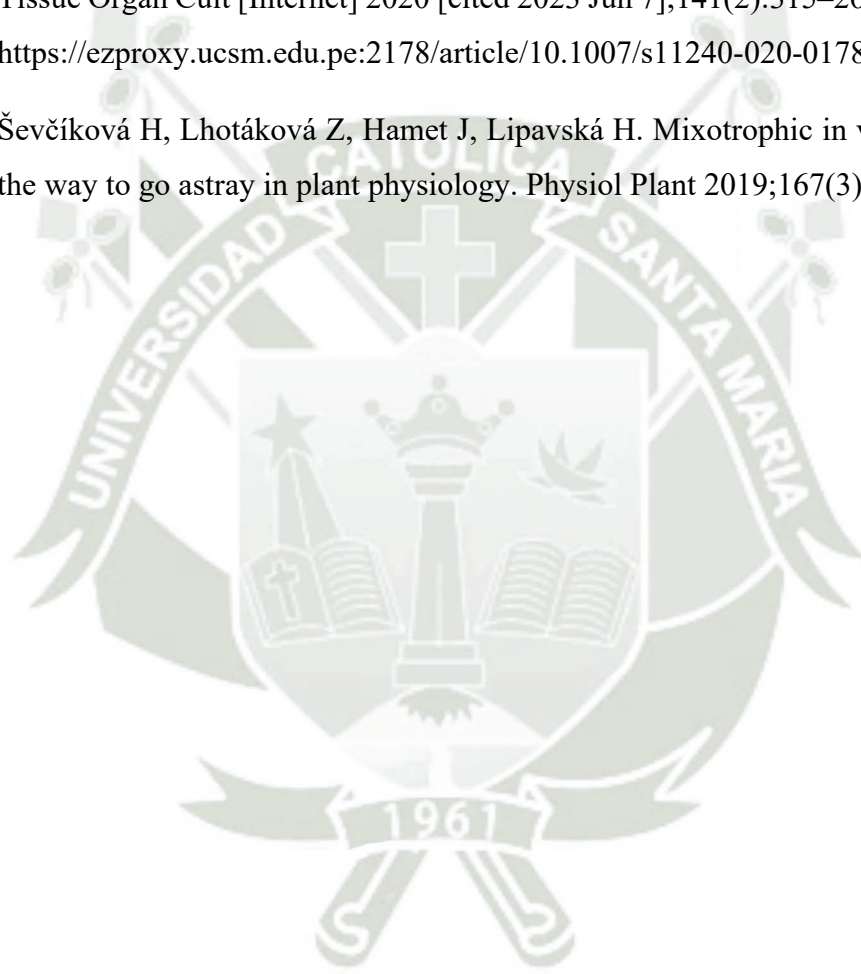
47. Mirzabe AH, Hajiahmad A, Fadavi A, Rafiee S. Temporary immersion systems (TISs): A comprehensive review. *J Biotechnol* 2022;357:56–83.
48. Etienne H, Bertrand B, Georget F, Lartaud M, Montes F, Dechamp E, et al. Development of coffee somatic and zygotic embryos to plants differs in the morphological, histochemical and hydration aspects. *Tree Physiol* [Internet] 2013;33(6):640–53. Available from: <https://academic.oup.com/treephys/article/33/6/640/1688667>
49. Ramírez-Mosqueda MA, Cruz-Cruz CA, editors. *Micropropagation Methods in Temporary Immersion Systems*. 1st ed. Humana New York, NY; 2024.
50. Vidal N, Sánchez C. Use of bioreactor systems in the propagation of forest trees. *Eng Life Sci* 2019;19(12):896–915.
51. Welander M, Persson J, Asp H, Zhu LH. Evaluation of a new vessel system based on temporary immersion system for micropropagation. *Sci Hortic* 2014;179:227–32.
52. Lotfi M, Werbrouck SPO. SETIS™, a novel variant within the temporary immersion bioreactors. *Acta Hortic* 2020;1285:253–7.
53. Villazon Camacho EE. Micropropagación in vitro de dos especies del género *Rubus* a partir de tres tipos de explantes [Internet]. 2017 [cited 2023 Jun 7]; Available from: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/20.500.12996/2918>
54. Dziejczak E, Jagła J. Micropropagation of *Rubus* and *Ribes* spp. In: Lambardi M, Ozudogru EA, Jain SM, editors. *Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants*. Humana Press, Totowa, NJ; 2012. page 149–60.
55. Amalia F, Debnath S, Yeoung Y. Effects of calcium gluconate and ascorbic acid on controlling shoot necrosis during micropropagation of primocane-fruiting raspberry (*Rubus idaeus* L.) cultivars. *Afr J Biotechnol* [Internet] 2015;13(47). Available from: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/124745>
56. Hunkova J, Libiaková G, Gajdošová A. Shoot proliferation ability of selected cultivars of *Rubus* spp. as influenced by genotype and cytokinin concentration. *Journal of Central European Agriculture* [Internet] 2016; Available from: <https://hrcak.srce.hr/ojs/index.php/jcea/article/view/4282>

57. Poothong S, Junnumsra I, Chumphukam O. In vitro Mineral Nutrients and Sucrose Affecting Growth and Development of Micropropagated Red Raspberry Shoots. *Thai J Sci Technol* 2020;9(1):118–28.
58. Hoepfner AS, Nestby R. Micropropagation of Two Red Raspberry Clones: Effect of Medium Composition on Multiplication, Microshoot Size and Rooting. *Acta Agriculturae Scandinavica* 1991;41(3):285–93.
59. Snir I. Micropropagation of red raspberry. *Sci Hortic* 1981;14(2):139–43.
60. Wu JH, Miller SA, Hall HK, Mooney PA. Factors affecting the efficiency of micropropagation from lateral buds and shoot tips of *Rubus*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* [Internet] 2009 [cited 2023 May 26];99(1):17–25. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11240-009-9571-5>
61. Debnath SC. Bioreactor-induced adventitious shoot regeneration affects genotype-dependent morphology but maintains clonal fidelity in red raspberry. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 2014;50(6):777–88.
62. Jones Castro F, Flores Mora D, Castro Fiorella J, Mora F. Establecimiento in vitro y pruebas preliminares de micropropagación en medio semisólido y líquido de frambuesa (*Rubus idaeus* L.). *Revista Tecnología en Marcha* [Internet] 2007;20(3):46–54. Available from: https://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/99
63. Calisaya Azpilcueta DA, Espinoza Villegas GE. Desarrollo de un protocolo para el establecimiento y multiplicación in vitro de *Vaccinium corymbosum* L. (arándano de arbusto alto) variedad Misty, a partir de segmentos nodales en un reactor de inmersión temporal. Universidad Católica de Santa María - UCSM2014;
64. Bošnjak D, Marković M, Agić D, Vinković T, Tkalec Kojić M, Ravnjak B, et al. The Influence of Nutrient Media Modification on the Morphological Parameters in Raspberry (*Rubus idaeus* L.) Micropropagation in the Liquid and Semi-solid Media. *Poljoprivreda* 2021;27(1):22–9.
65. Jaredić I. Mikropropagacija maline (*Rubus idaeus* L.) u tekućem imerznom sustavu [Internet]. 2018; Available from: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:379642>

66. Clapa D, Hârta M, Pop CV. Micropropagation of Raspberries (*Rubus idaeus* L.) in Liquid Media by Temporary Immersion Bioreactor in Comparison with Gelled Media. 2021; Available from: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DJ20220190187>
67. Poothong S, Reed BM. Increased CaCl₂, MgSO₄, and KH₂PO₄ improve the growth of micropropagated red raspberries. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* [Internet] 2015;51(6):648–58. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11627-015-9720-y>
68. Graham J, Iasi L, Millam S. Genotype-specific regeneration from a number of *Rubus* cultivars. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 1997;48(3):167–73.
69. Georgieva L, Tsvetkov I, Georgieva M, Kondakova V. New protocol for in vitro propagation of berry plants by TIS bioreactor. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 2016;22(5):745–51.
70. Welander M. In vitro culture of raspberry (*Rubus idaeus*) for mass propagation. *Journal of Horticultural Science* 1985;60(4):493–9.
71. Red SPO, Light FR, Roberto SR, Darouez H, Werbrouck SPO. Red and Far-Red Light Combined with Trans-Cinnamic Acid Enhances In Vitro Rooting and Reduces Callus Formation in Lavender. *Horticulturae* [Internet] 2024;10(9):954. Available from: <https://www.mdpi.com/2311-7524/10/9/954>
72. Bairu MW, Kane ME. Physiological and developmental problems encountered by in vitro cultured plants. *Plant Growth Regul* 2011;63(2):101–3.
73. Mezzetti B, Savini G, Carnevali F, Mott D. Plant genotype and growth regulators interaction affecting in vitro morphogenesis of blackberry and raspberry. *Biol Plant* 1997;39(1):139–50.
74. Leitzke LN, Damiani CR, Schuch MW. Culture environment, IBA concentration and cultivation time on in vitro rooting of blackberry and raspberry. *Rev Bras Frutic* [Internet] 2009;31(2):582–7. Available from: <https://www.scielo.br/j/rbf/a/Cyhr4thLdCfmzL5f9cGTYCk/abstract/?lang=en&format=html>

75. Georgieva M, Kondakova V, Yancheva S. A comparative study on raspberry cultivars in micropropagation. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 2020;26(3):527–32.
76. Sabooni N, Shekafandeh A, Gharaghani A, Teixeira JA, Silva DA, Silva D. Tissue Culture of *Rubus* sp. by Different Methods and Assessment of Genetic Fidelity of Regenerated Plants Using RAPD. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 2022;87(3):223–30.
77. Kim C, Dai W. Plant regeneration of red raspberry (*Rubus idaeus*) cultivars ‘Joan J’ and ‘Polana.’ *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 2020;56(3):390–7.
78. Lebedev V, Arkaev M, Dremova M, Pozdniakov I, Shestibratov K. Effects of Growth Regulators and Gelling Agents on Ex Vitro Rooting of Raspberry. *Plants* [Internet] 2018;8(1). Available from: <https://www.mdpi.com/2223-7747/8/1/3>
79. Zhang W, Dai W. In vitro plant regeneration of ‘Prelude’ red raspberry (*Rubus idaeus* L.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* [Internet] 2023 [cited 2023 Jun 7];1–6. Available from: <https://ezproxy.ucsm.edu.pe:2178/article/10.1007/s11627-023-10355-3>
80. Kozai T, Kubota C. Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. *J Plant Res* 2001;114(4):525–37.
81. Deng R, Donnelly DJ. In Vitro Hardening of Red Raspberry by CO₂ Enrichment and Reduced Medium Sucrose Concentration. *HortScience* [Internet] 1993;28(10):1048–51. Available from: <https://journals.ashs.org/hortsci/view/journals/hortsci/28/10/article-p1048.xml>
82. Poothong S, Reed BM. Optimizing shoot culture media for *Rubus* germplasm: the effects of NH₄⁺, NO₃⁻, and total nitrogen. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 2016;52(3):265–75.
83. Dewir YH, Al-Ali AM, Rihan HZ, Alshahrani T, Alwahibi MS, Almutairi KF, et al. Effects of Artificial Light Spectra and Sucrose on the Leaf Pigments, Growth, and Rooting of Blackberry (*Rubus fruticosus*) Microshoots. *Agronomy* 2023;13(1).
84. Muñíz R. La propagación in vitro de plantas con Sistemas de Inmersión Temporal. Una Tecnología Apropriada para la agricultura sustentable. *Tekhne* [Internet]

- 2018;21(3):43–50. Available from:
<https://revistasenlinea.saber.ucab.edu.ve/index.php/tekhne/article/view/3807>
85. Anderson WC. Tissue culture propagation of red and black raspberries, *Rubus idaeus* and *R. Occidentalis*. *Acta Horti* 1980;(112):13–20.
86. Silveira AA da C, Lopes FJF, Sibov ST. Micropropagation of *Bambusa oldhamii* Munro in heterotrophic, mixotrophic and photomixotrophic systems. *Plant Cell Tissue Organ Cult* [Internet] 2020 [cited 2023 Jun 7];141(2):315–26. Available from:
<https://ezproxy.ucsm.edu.pe:2178/article/10.1007/s11240-020-01788-4>
87. Ševčíková H, Lhotáková Z, Hamet J, Lipavská H. Mixotrophic in vitro cultivations: the way to go astray in plant physiology. *Physiol Plant* 2019;167(3):365–77.



ANEXOS

Anexo 1. Prueba estadística de Kruskal-Wallis para tamaño de brotes en multiplicación por biorreactores.

Prueba

Hipótesis nula H_0 : Todas las medianas son iguales

Hipótesis alterna H_1 : Al menos una mediana es diferente

Método	GL	Valor H	Valor p
No ajustado para empates	8	5.53	0.700
Ajustado para empates	8	5.56	0.697

Estadísticas descriptivas

Biorreactor	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
B1	5	1.50	33.8	1.95
B2	5	0.90	16.5	-1.17
B3	5	1.00	24.5	0.27
B4	5	1.05	25.2	0.40
B5	5	1.13	22.0	-0.18
B6	5	0.70	20.1	-0.52
B7	5	0.90	19.1	-0.70
B8	5	1.00	22.7	-0.05
B9	5	1.30	23.1	0.02
General	45		23.0	

Anexo 2. Prueba estadística de Kruskal-Wallis para número de brotes en multiplicación por biorreactor.

Prueba

Hipótesis nula H_0 : Todas las medianas son iguales

Hipótesis alterna H_1 : Al menos una mediana es diferente

Método	GL	Valor H	Valor p
No ajustado para empates	8	6.67	0.573
Ajustado para empates	8	7.10	0.525

Estadísticas descriptivas

Biorreactor	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
B1	5	1	14.9	-1.46
B2	5	2	22.7	-0.05
B3	5	2	19.3	-0.67
B4	5	2	26.0	0.54
B5	5	4	34.1	2.00
B6	5	3	25.9	0.52
B7	5	2	21.8	-0.22
B8	5	2	22.1	-0.16
B9	5	1	20.2	-0.51
General	45		23.0	

Anexo 3. Prueba estadística de ANOVA por Tukey para número de raíces en los tratamientos de enraizamiento *in vitro*.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	MC	Valor F	Valor p
		Ajust.	Ajust.		
TRATAMIENTO	8	166.4	20.806	5.82	0.00009
Error	36	128.8	3.578		
Total	44	295.2			

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

TRATAMIENTO	N	Media	Agrupación
T3	5	4.20	A
T7	5	4.00	A
T1	5	3.80	A B
T2	5	3.40	A B
T9	5	0.000000	B
T8	5	0.000000	B
T4	5	0.000000	B
T6	5	0.000000	B
T5	5	0.000000	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 4. Prueba estadística de ANOVA por Tukey para longitud de raíces en los tratamientos de enraizamiento *in vitro*.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	MC	Valor F	Valor p
		Ajust.	Ajust.		
TRATAMIENTO	8	62.83	7.8535	8.66	0.000002
Error	36	32.63	0.9064		
Total	44	95.46			

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

TRATAMIENTO	N	Media	Agrupación
T7	5	3.186	A
T1	5	2.580	A
T2	5	1.492	A B
T3	5	0.544	B
T9	5	0.000000	B
T8	5	0.000000	B
T4	5	0.000000	B
T6	5	0.000000	B
T5	5	0.000000	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 5. Prueba estadística de ANOVA para altura de brotes de multiplicación *in vitro* a diferente concentración de sacarosa.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	MC	Valor F	Valor p
		Ajust.	Ajust.		
Tratamientos	1	0.005783	0.005783	0.11	0.747
Error	8	0.414025	0.051753		
Total	9	0.419808			

Anexo 6. Prueba estadística de ANOVA para número de brotes de multiplicación *in vitro* a diferente concentración de sacarosa.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	MC	Valor F	Valor p
		Ajust.	Ajust.		
Tratamientos	1	1.600	1.600	0.56	0.475
Error	8	22.800	2.850		
Total	9	24.400			

Anexo 7. Prueba estadística de ANOVA para coeficiente de multiplicación en biorreactor a diferente concentración de sacarosa.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	MC	Valor F	Valor p
		Ajust.	Ajust.		
TRATAMIENTOS	1	4.900	4.9000	6.53	0.034
Error	8	6.000	0.7500		
Total	9	10.900			

Anexo 8. Prueba estadística de ANOVA para longitud de brotes en biorreactor a diferente concentración de sacarosa.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	MC	Valor F	Valor p
		Ajust.	Ajust.		
TRATAMIENTOS	1	0.1731	0.17314	4.38	0.070
Error	8	0.3165	0.03956		
Total	9	0.4897			

Anexo 9. Prueba estadística de ANOVA para número de raíces en los tratamientos de enraizamiento *in vitro* a diferentes concentraciones de sacarosa.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	MC	Valor F	Valor p
		Ajust.	Ajust.		
Modelo	7	78.17	11.168	2.00	0.086
Lineal	4	48.10	12.025	2.15	0.097
Tratamiento	3	20.88	6.958	1.25	0.310
Sacarosa	1	27.22	27.225	4.87	0.035
Interacciones de 2 términos	3	30.07	10.025	1.79	0.168
Tratamiento*Sacarosa	3	30.07	10.025	1.79	0.168
Error	32	178.80	5.587		
Total	39	256.97			

Anexo 10. Prueba estadística de ANOVA para longitud de raíces en los tratamientos de enraizamiento *in vitro* a diferentes concentraciones de sacarosa.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	MC	Valor F	Valor p
		Ajust.	Ajust.		
Modelo	7	41.171	5.882	4.91	0.001
Lineal	4	19.912	4.978	4.15	0.008
Tratamiento	3	13.734	4.578	3.82	0.019
Sacarosa	1	6.178	6.178	5.15	0.030
Interacciones de 2 términos	3	21.259	7.086	5.91	0.003
Tratamiento*Sacarosa	3	21.259	7.086	5.91	0.003
Error	32	38.367	1.199		
Total	39	79.538			

Anexo 11. Prueba estadística de ANOVA para número de brotes en los tratamientos de multiplicación *in vitro* frente a biorreactor.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	MC	Valor F	Valor p
		Ajust.	Ajust.		
Ambiente	1	19.60	19.600	5.44	0.048
Error	8	28.80	3.600		
Total	9	48.40			

Anexo 12. Prueba estadística de ANOVA para longitud de brotes en los tratamientos de multiplicación *in vitro* frente a biorreactor.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	MC	Valor F	Valor p
		Ajust.	Ajust.		
Ambiente	1	0.4849	0.48489	8.14	0.021
Error	8	0.4767	0.05959		
Total	9	0.9616			

Anexo 13. Gráficas de los resultados obtenidos en multiplicación de brotes en biorreactor.

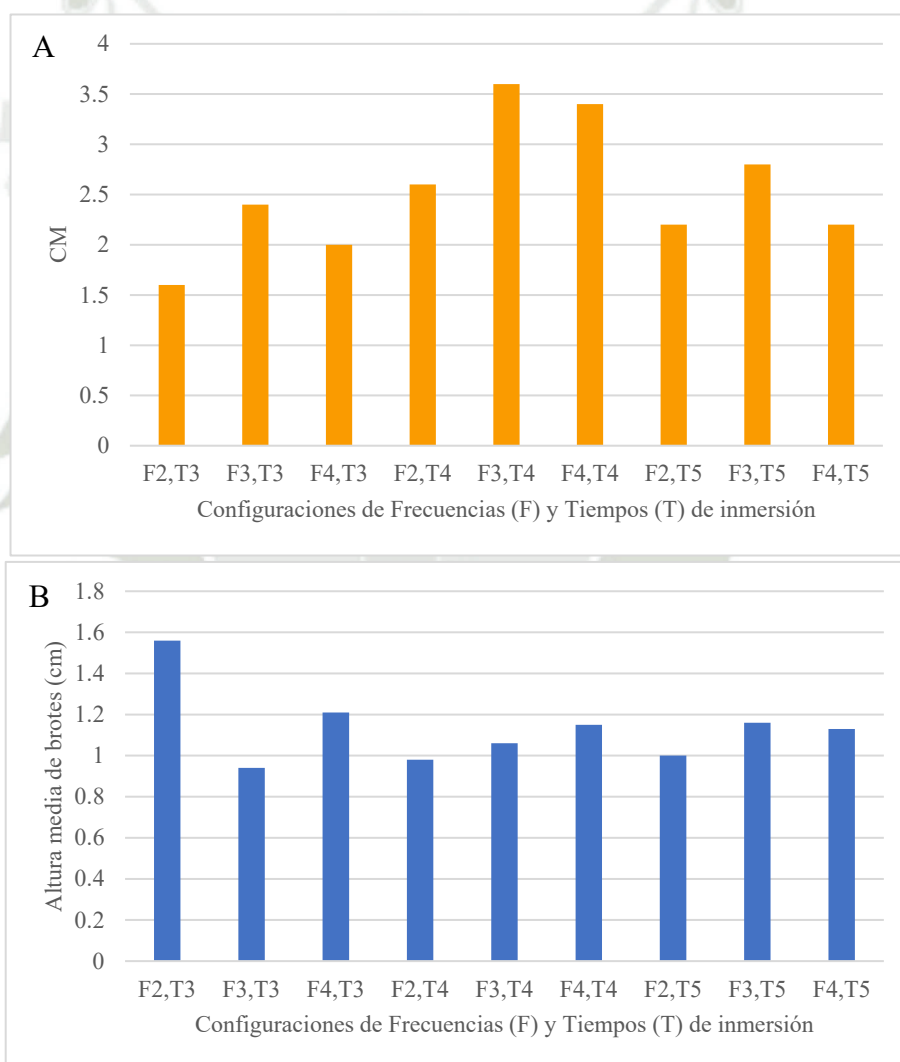


Figura 1. Comparación de cada configuración de tiempo (T) y frecuencia (F) de inmersión obtenidas en biorreactor. A) Coeficiente de Multiplicación. B) Altura media de brotes.

Anexo 14. Gráficas de los resultados obtenidos en enraizamiento de brotes *in vitro*.

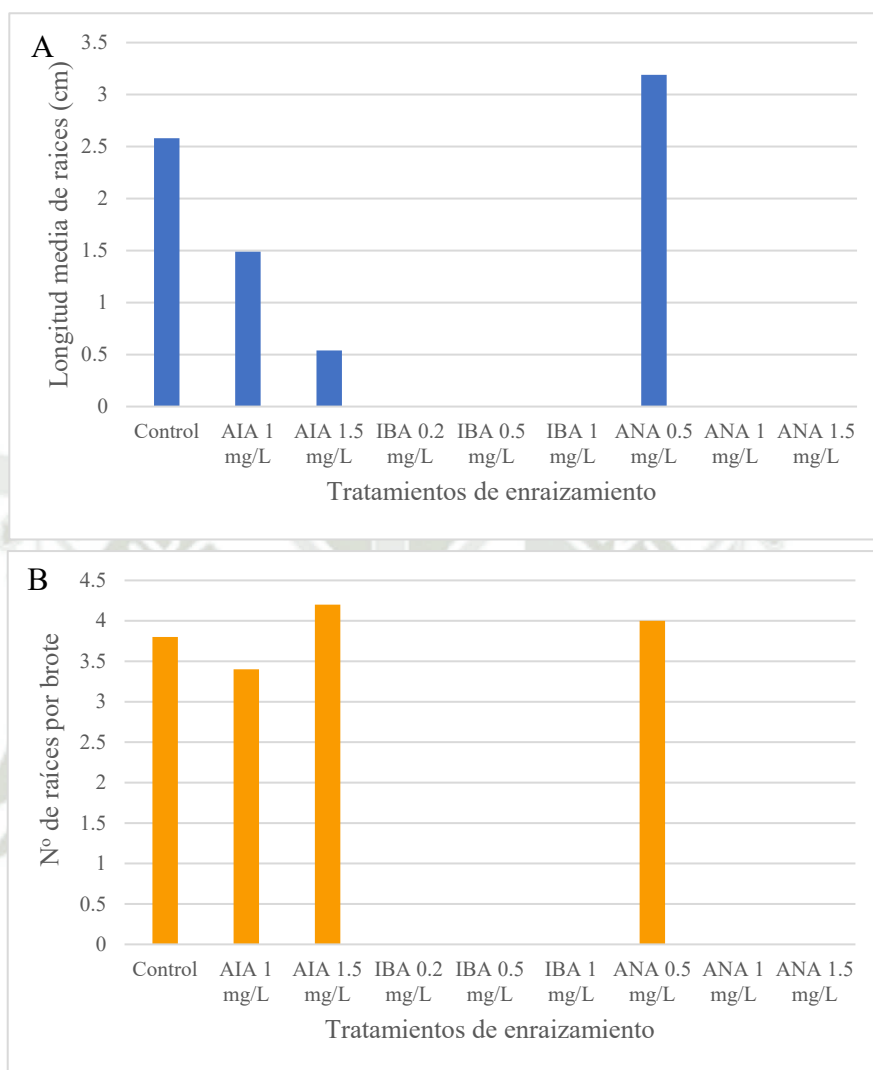


Figura 2. Comparación de los tratamientos de enraizamiento a diferentes concentraciones de auxinas. A) Longitud media de raíces.

B) Número de raíces por brote.

Anexo 15. Gráficas de la evaluación del efecto de la concentración de sacarosa en el cultivo *in vitro*.

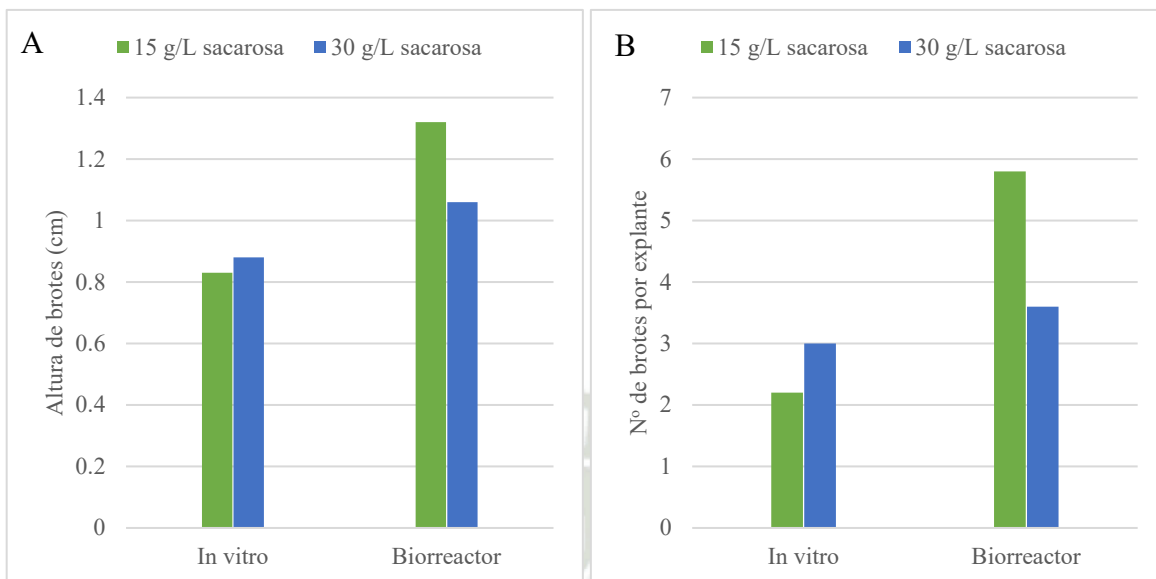


Figura 3. Comparación de cultivo *in vitro* vs biorreactor en diferente concentración de sacarosa. A) Altura de brotes. B) Número de brotes por explante.

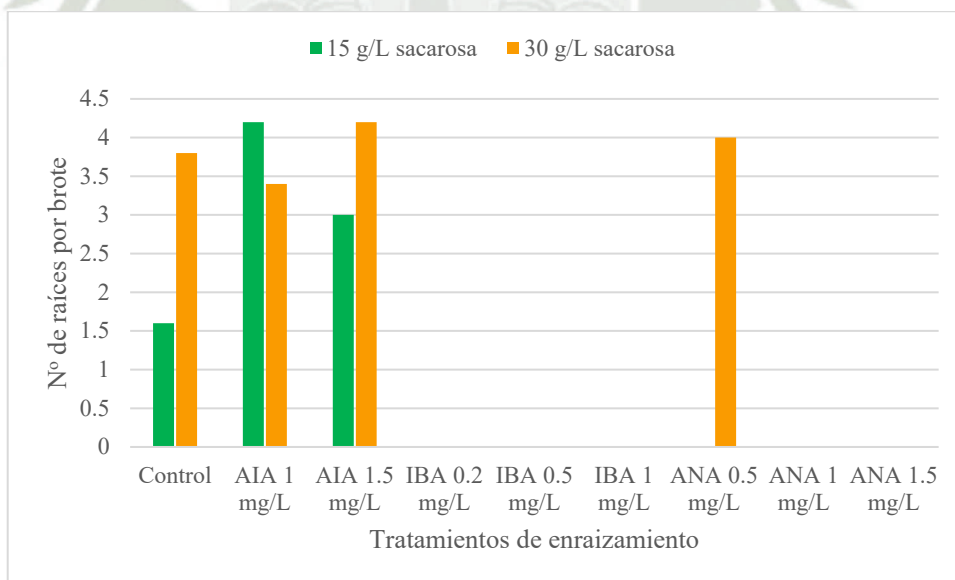


Figura 4. Número de raíces por brote según tratamiento y concentración de sacarosa.

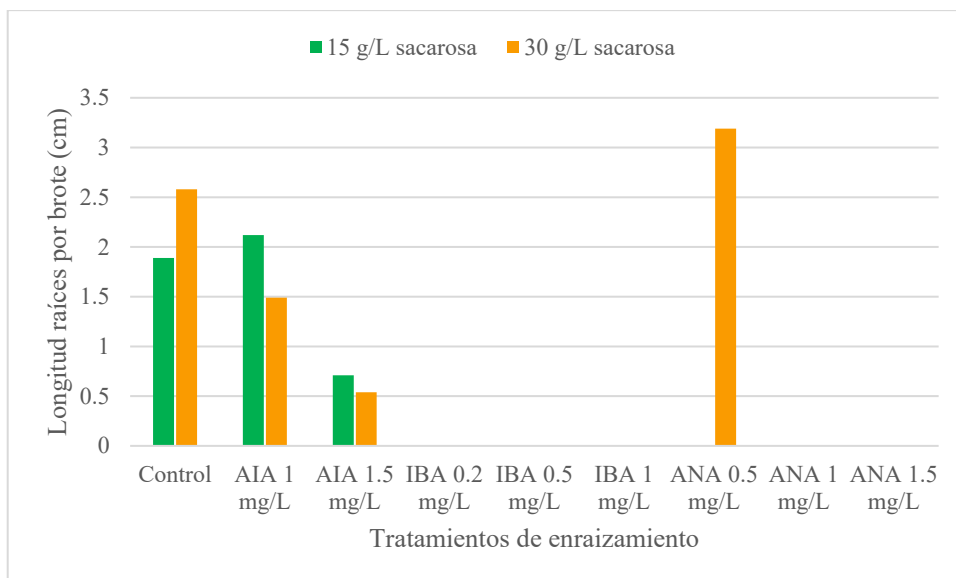


Figura 5. Longitud de raíces por brote según tratamiento y concentración de sacarosa.

Anexo 16. Evidencias fotográficas del trabajo de investigación.

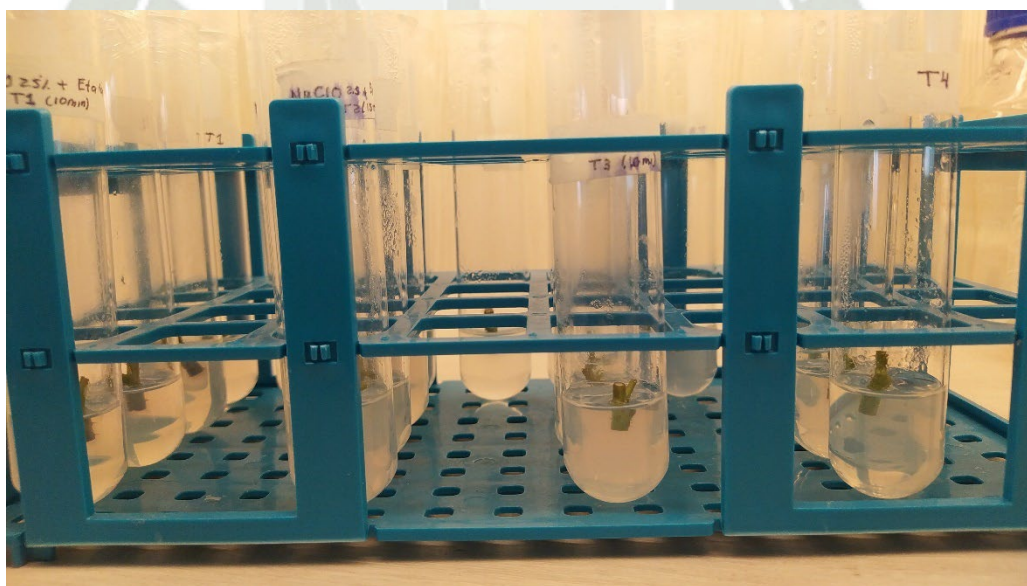


Figura 6. Segmentos nodales de frambuesa en tubos de ensayo para su establecimiento *in vitro*.

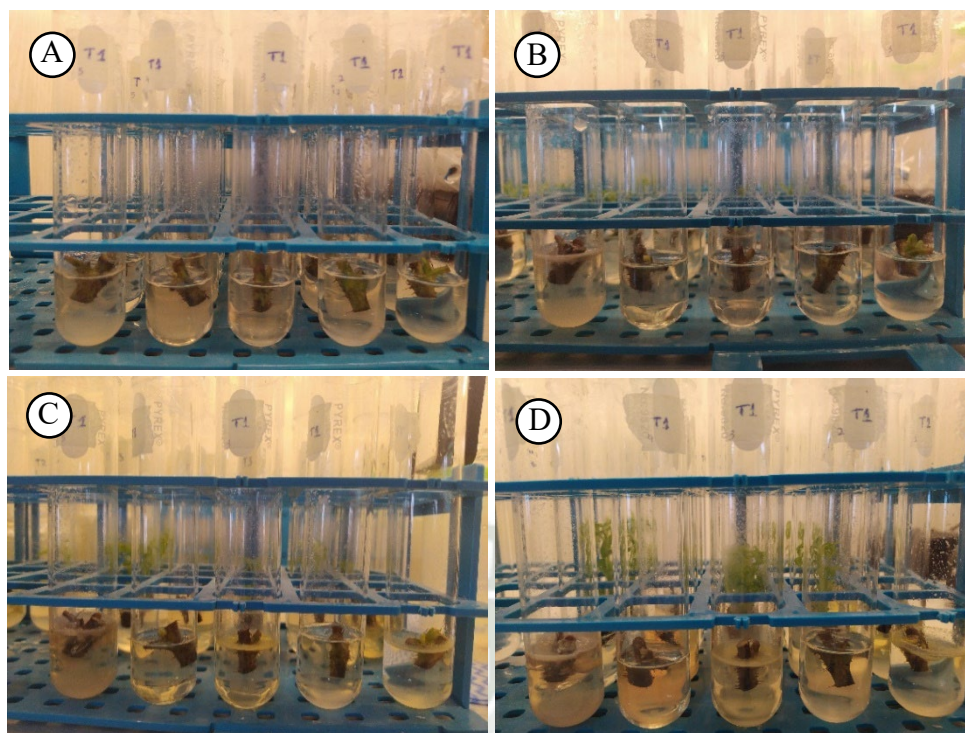


Figura 7. Establecimiento *in vitro* del Tratamiento 1 (T1) de desinfección en el transcurso del tiempo. A) Semana 1. B) Semana 2. C) Semana 3. D) Semana 4.

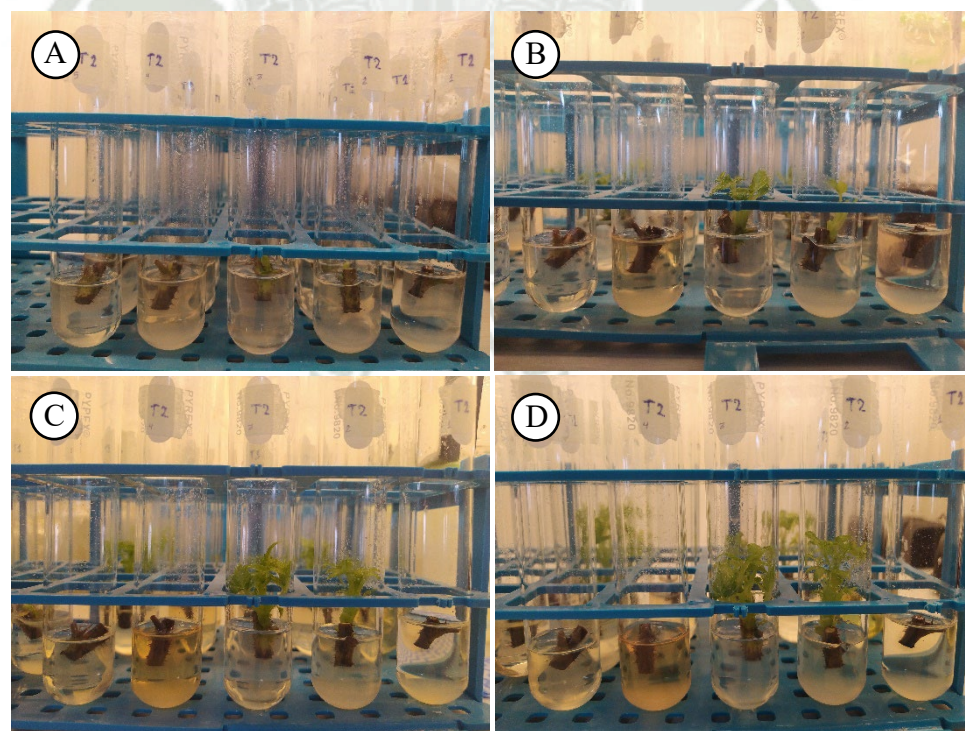


Figura 8. Establecimiento *in vitro* del Tratamiento 2 (T2) de desinfección en el transcurso del tiempo. A) Semana 1. B) Semana 2. C) Semana 3. D) Semana 4.

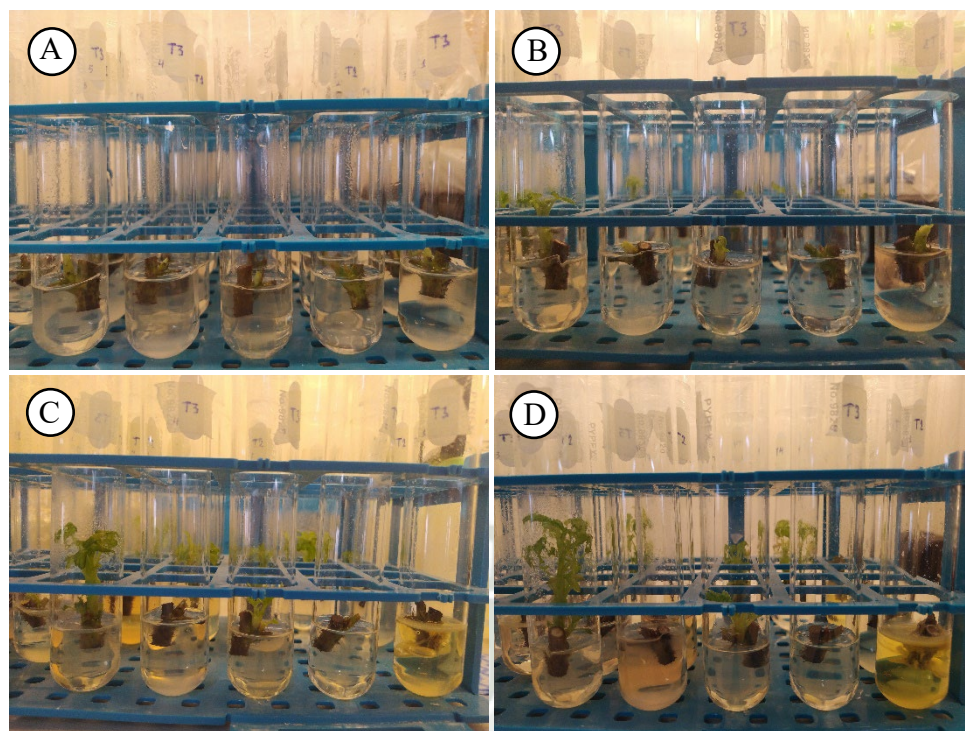


Figura 9. Establecimiento *in vitro* del Tratamiento 3 (T3) de desinfección en el transcurso del tiempo. A) Semana 1. B) Semana 2. C) Semana 3. D) Semana 4.

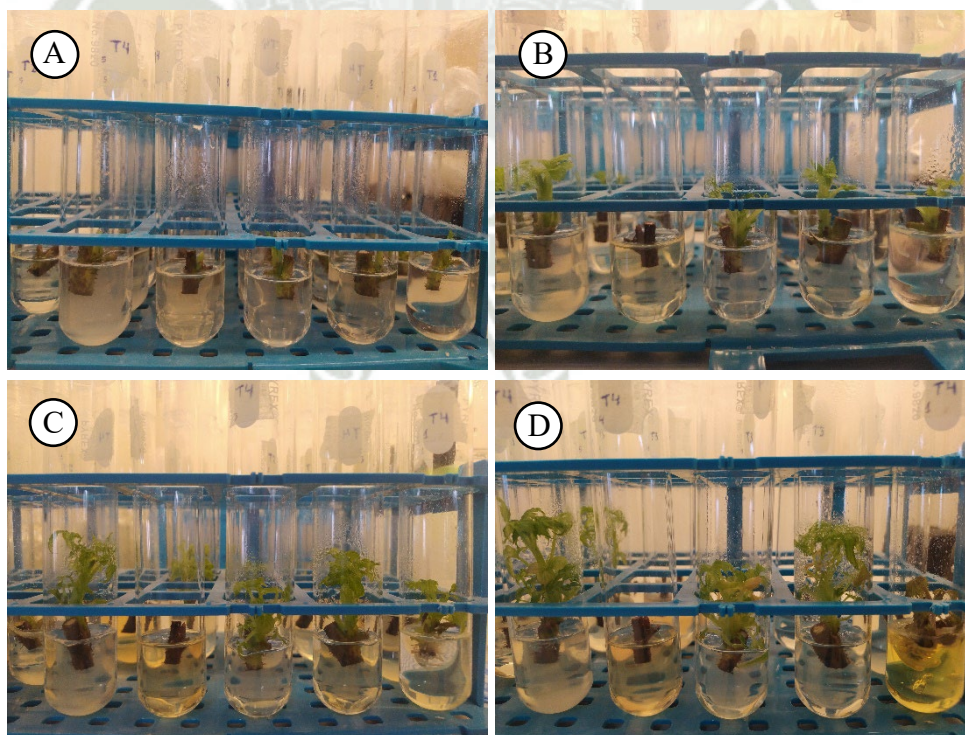


Figura 10. Establecimiento *in vitro* del Tratamiento 4 (T4) de desinfección en el transcurso del tiempo. A) Semana 1. B) Semana 2. C) Semana 3. D) Semana 4.



Figura 11. Yema de frambuesa establecida *in vitro*.



Figura 12. Brotes de frambuesa a partir de un segmento nodal después de 4 semanas de cultivo.

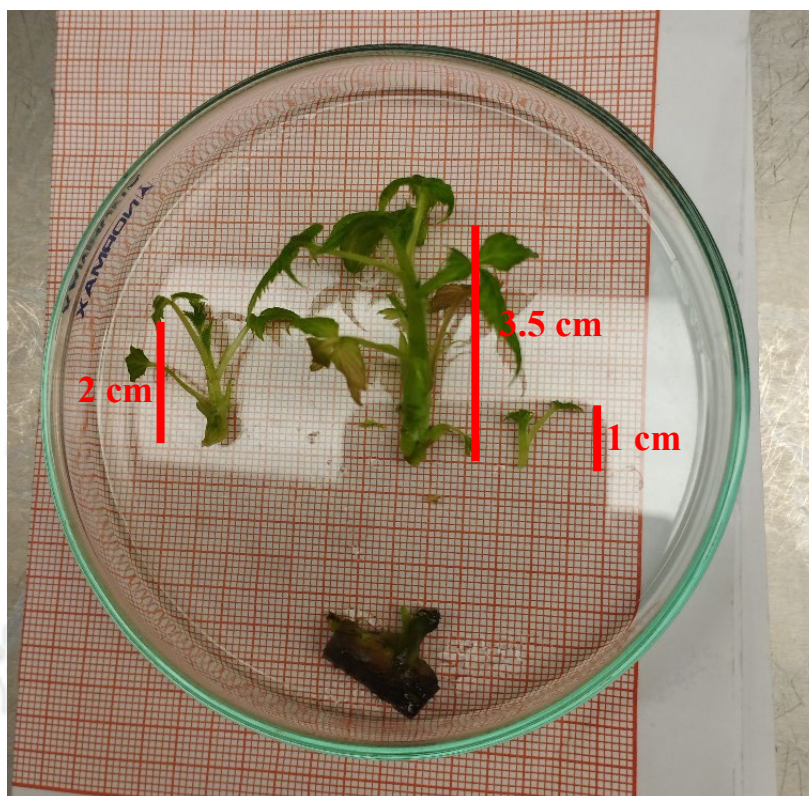


Figura 13. Brotes separados del segmento nodal del establecimiento in vitro con medio suplementado con BAP.



Figura 14. Brotes de 1 cm de longitud para iniciar cultivos en biorreactor e *in vitro*.

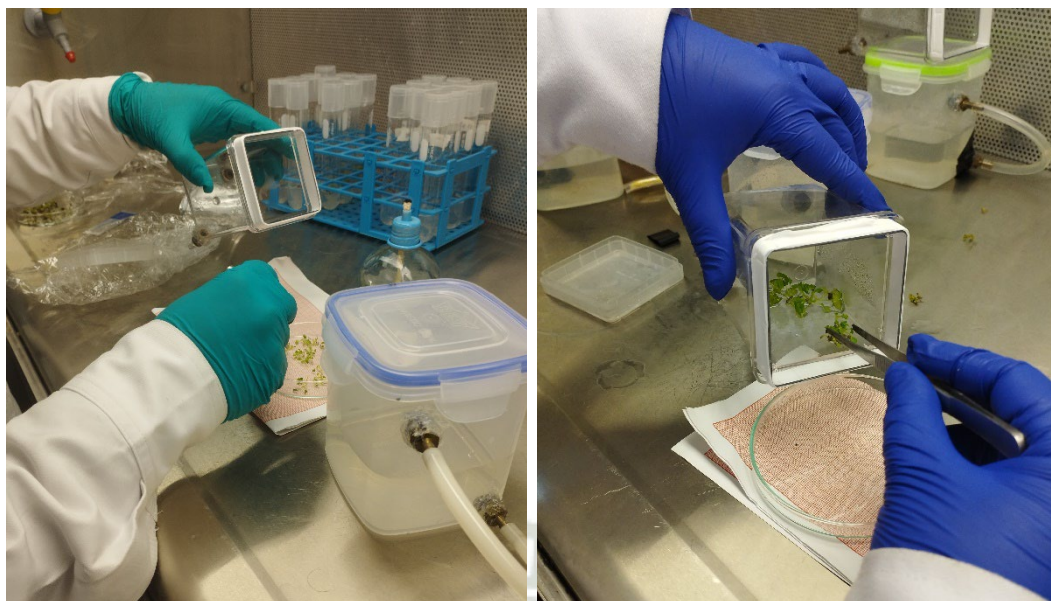


Figura 15. Introducción de los brotes de frambuesa en los biorreactores.

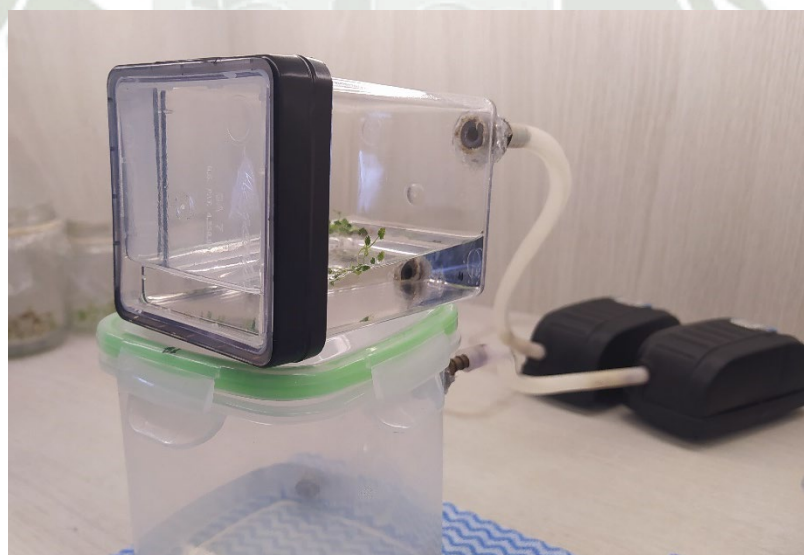


Figura 16. Biorreactor operando en fase de inmersión.

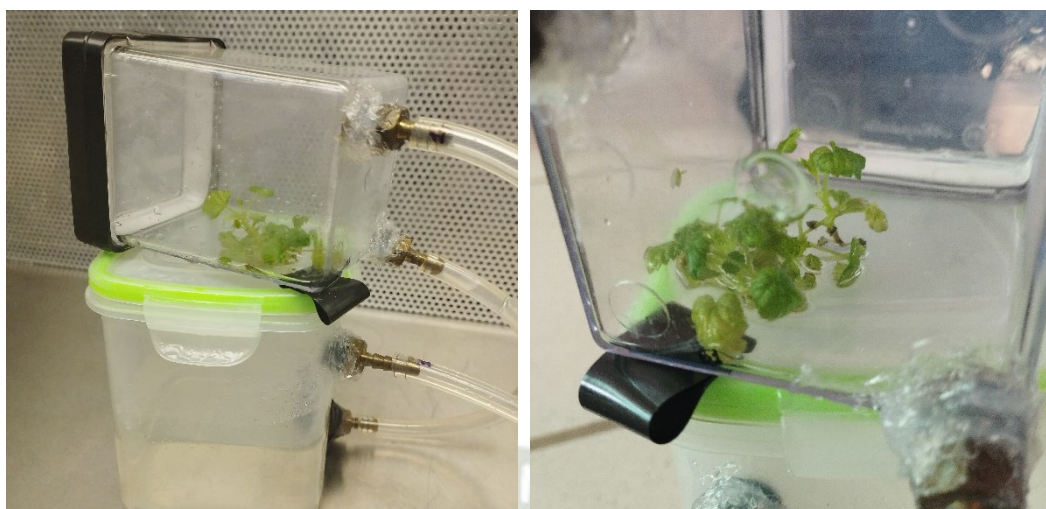


Figura 17. Plantas cultivadas en biorreactor con 30 g/L de sacarosa en el medio.



Figura 18. Plantas cultivadas en biorreactor con 15 g/L de sacarosa en el medio (ambiente mixotrófico).

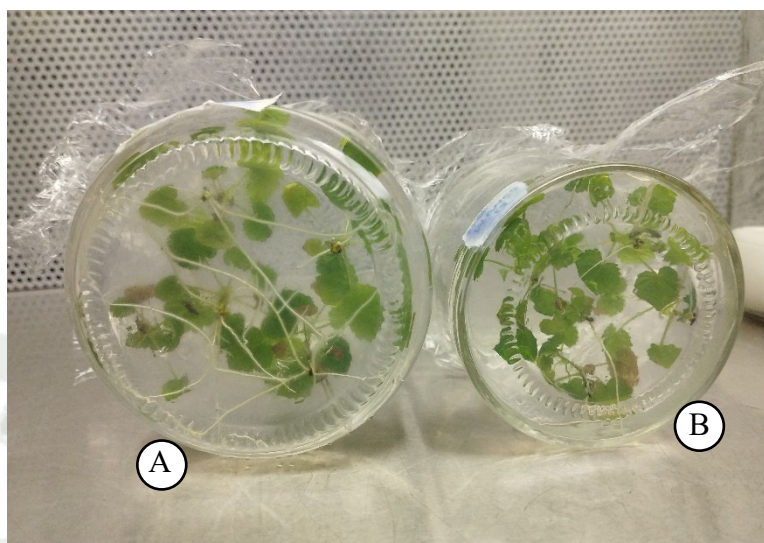


Figura 19. Enraizamiento de frambuesas en $\frac{1}{2}$ MS sin auxinas.

A) 30g/L de sacarosa. B) 15 g/L de sacarosa.

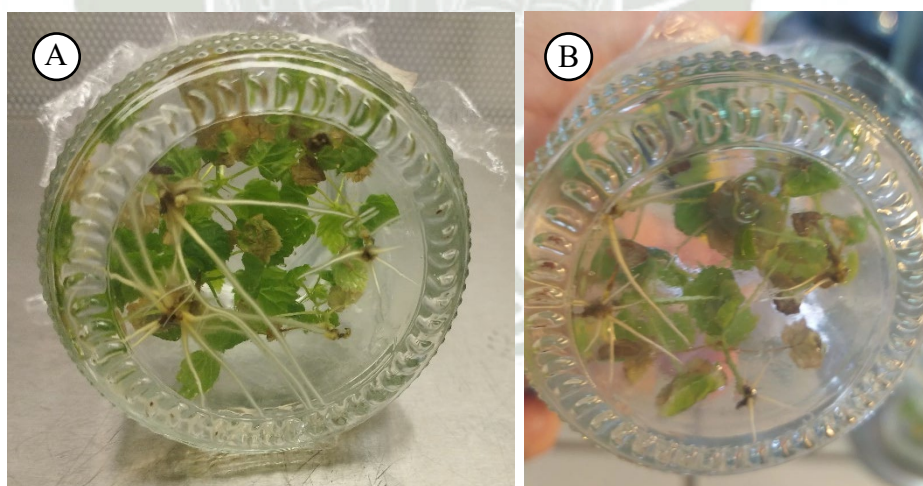


Figura 20. Enraizamiento de frambuesas en $\frac{1}{2}$ MS con 1 mg/L de AIA.

A) 30 g/L de sacarosa. B) 15 g/L de sacarosa.

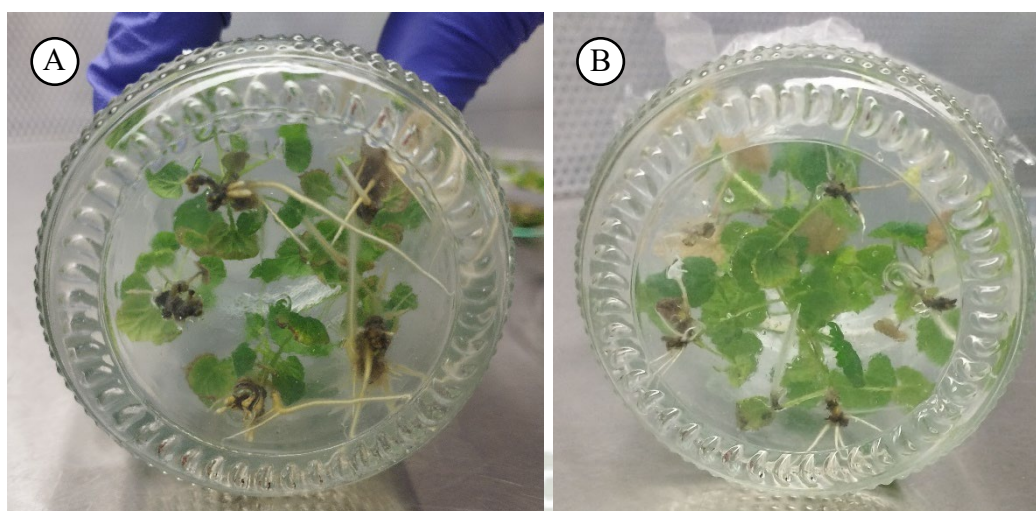


Figura 21. Enraizamiento de frambuesas en $\frac{1}{2}$ MS con 1.5 mg/L de AIA.

A) 30 g/L de sacarosa. B) 15 g/L de sacarosa.

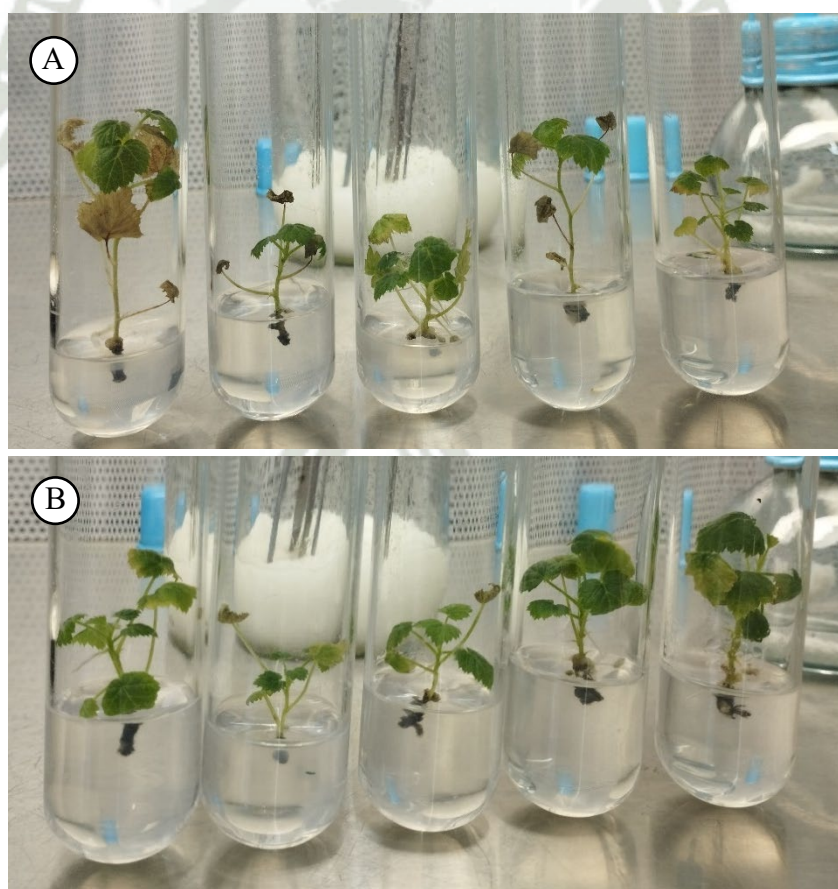


Figura 22. Enraizamiento de frambuesas en $\frac{1}{2}$ MS con 0.2 mg/L de IBA.

A) 30 g/L de sacarosa. B) 15 g/L de sacarosa.

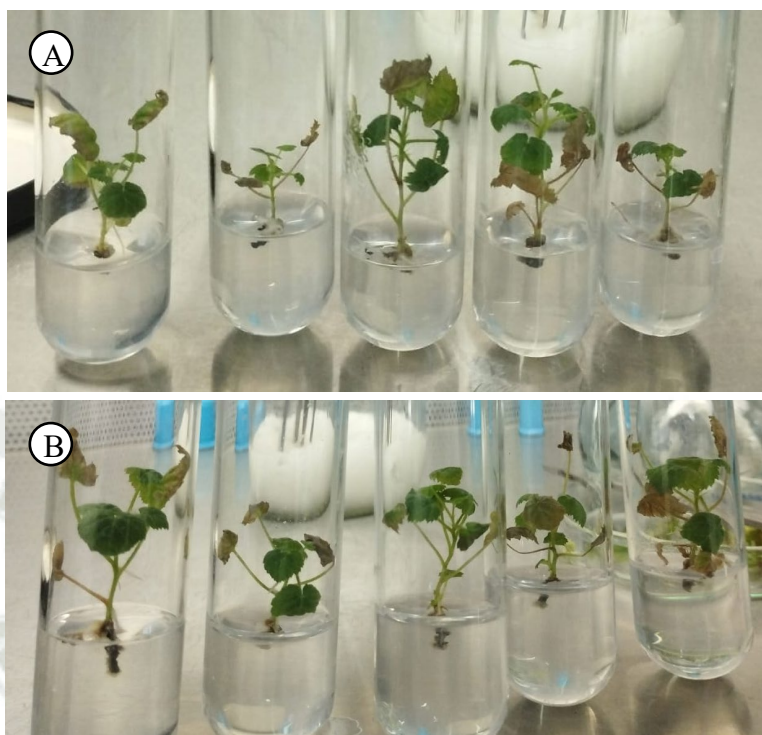


Figura 23. Enraizamiento de frambuesas en $\frac{1}{2}$ MS con 0.5 mg/L de IBA.

A) 30 g/L de sacarosa. B) 15 g/L de sacarosa.

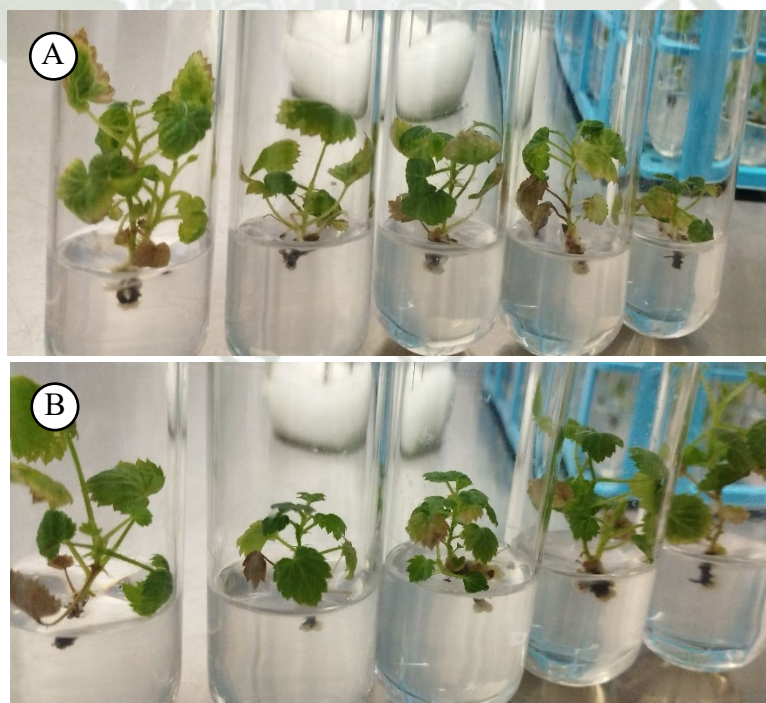


Figura 24. Enraizamiento de frambuesas en $\frac{1}{2}$ MS con 1 mg/L de IBA.

A) 30 g/L de sacarosa. B) 15 g/L de sacarosa.

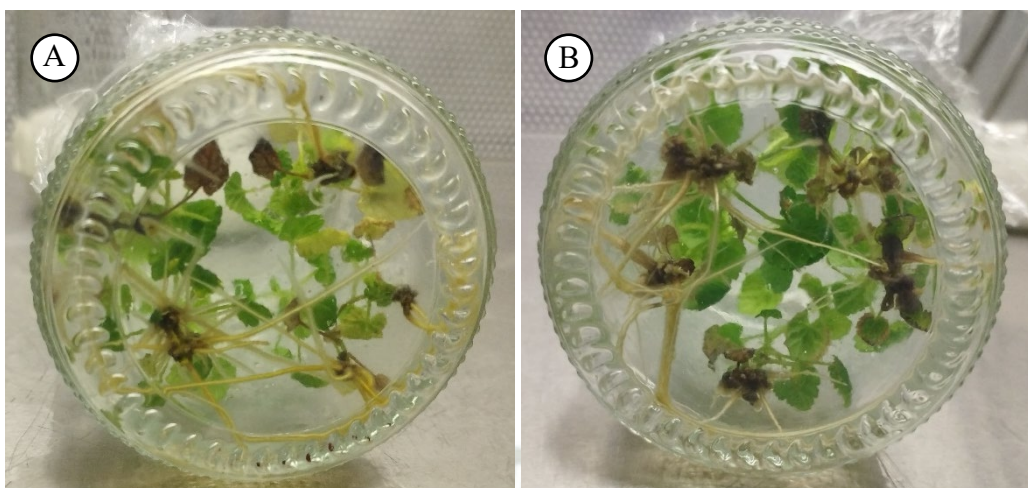


Figura 25. Enraizamiento de frambuesas en $\frac{1}{2}$ MS con 0.5 mg/L de ANA.

A) 30 g/L de sacarosa. B) 15 g/L de sacarosa.

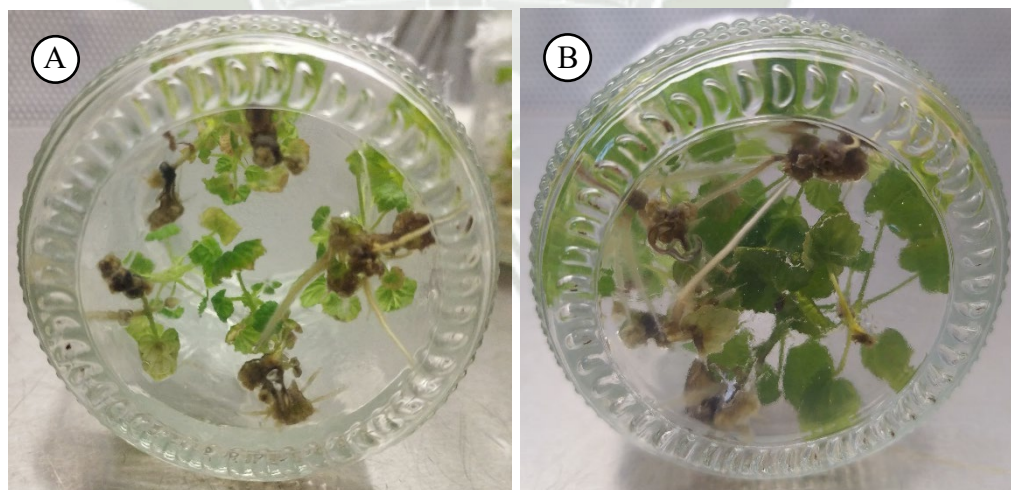


Figura 26. Enraizamiento de frambuesas en $\frac{1}{2}$ MS con 1 mg/L de ANA.

A) 30 g/L de sacarosa. B) 15 g/L de sacarosa.

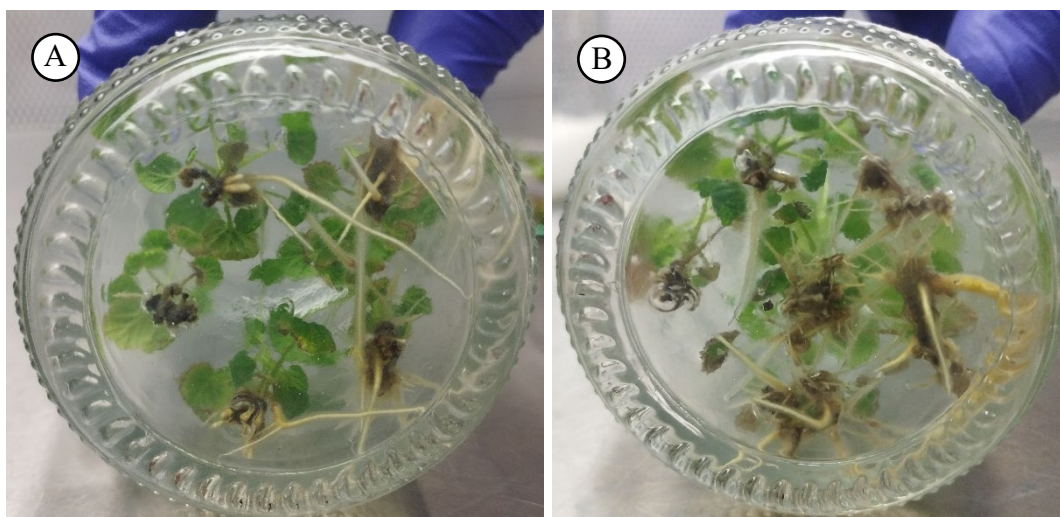


Figura 27. Enraizamiento de frambuesas en $\frac{1}{2}$ MS con 1.5 mg/L de ANA.

A) 30 g/L de sacarosa. B) 15 g/L de sacarosa.

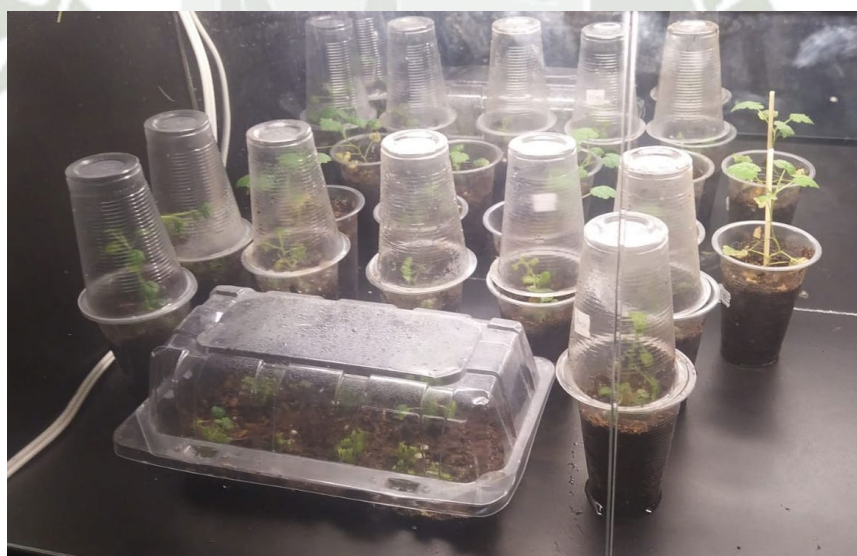


Figura 28. Aclimatación de plántulas enraizadas *in vitro*.

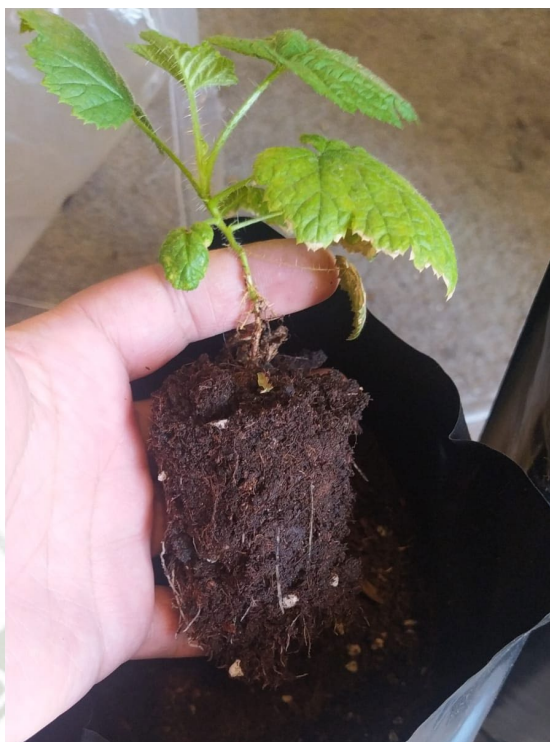


Figura 29. Brote de frambuesa aclimatado y con formación de raíces sanas.

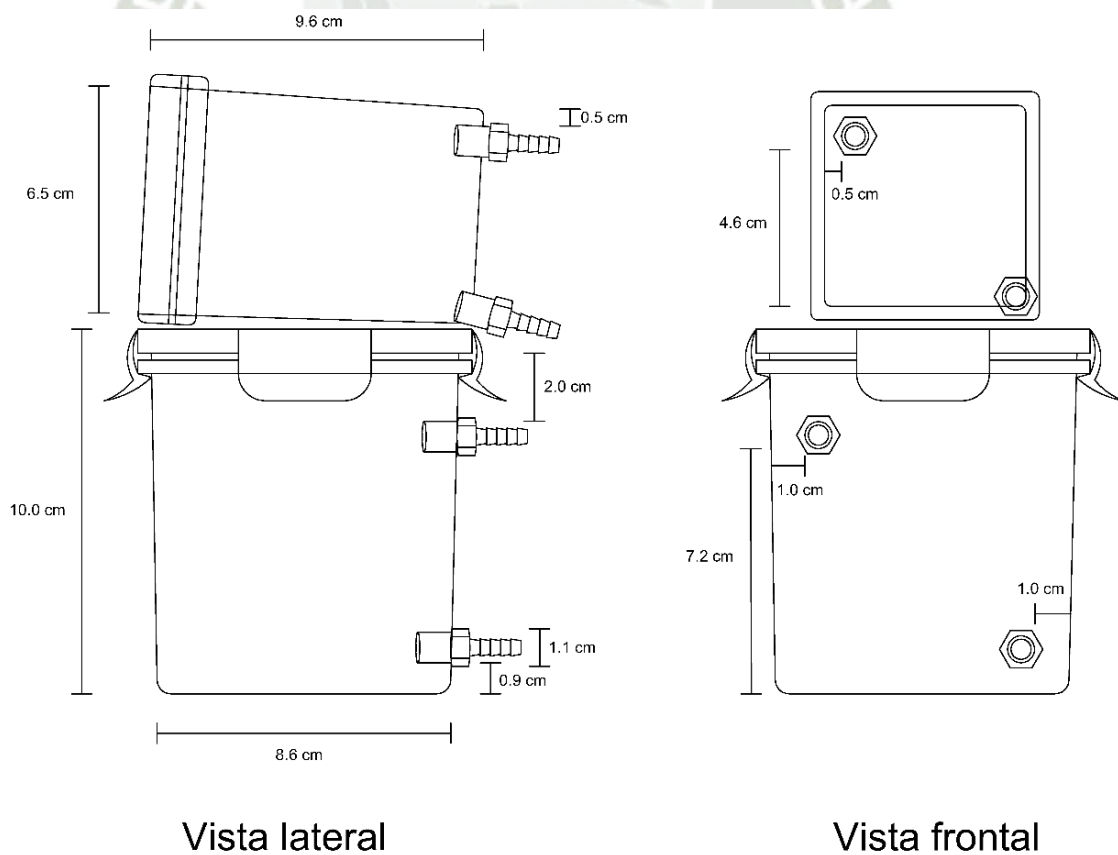


Figura 30. Plantines de frambuesa producidos por el presente trabajo aclimatados.



Figura 31. Plantas madre en floración y fructificación.

Anexo 17. Planos del biorreactor



Vista lateral

Vista frontal

Figura 32. Planos del biorreactor en vista lateral y frontal.

Anexo 18. Figuras complementarias.

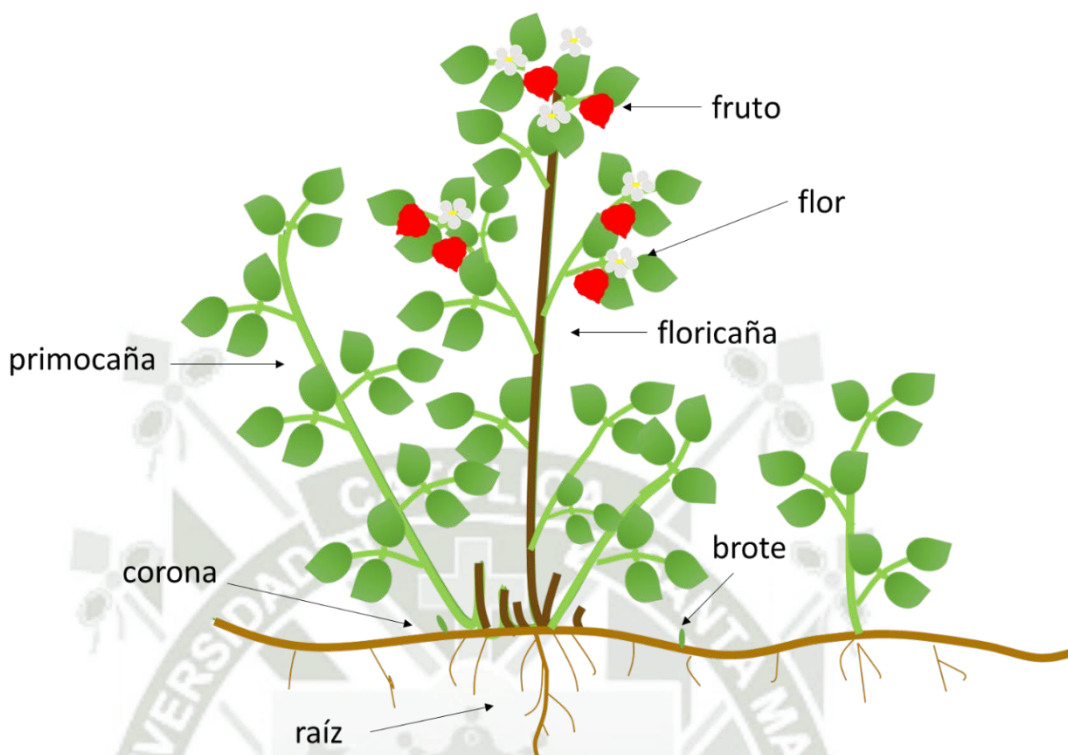


Figura 33. Estructura de la planta de Rubus idaeus (frambuesa)

Nota: Elaboración propia

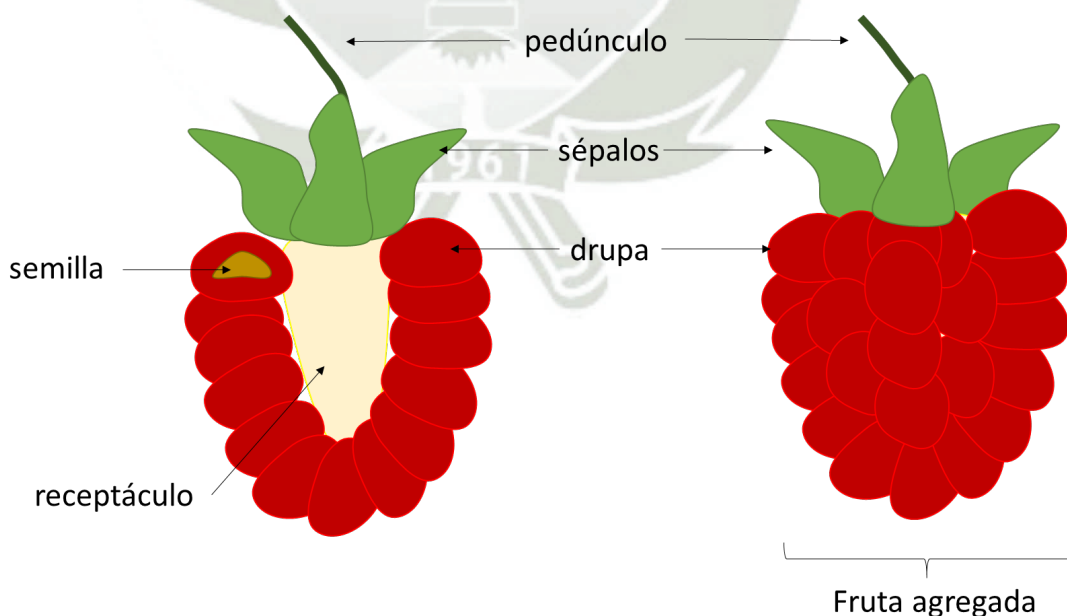


Figura 34. Partes del fruto de frambuesa.

Nota: Elaboración propia

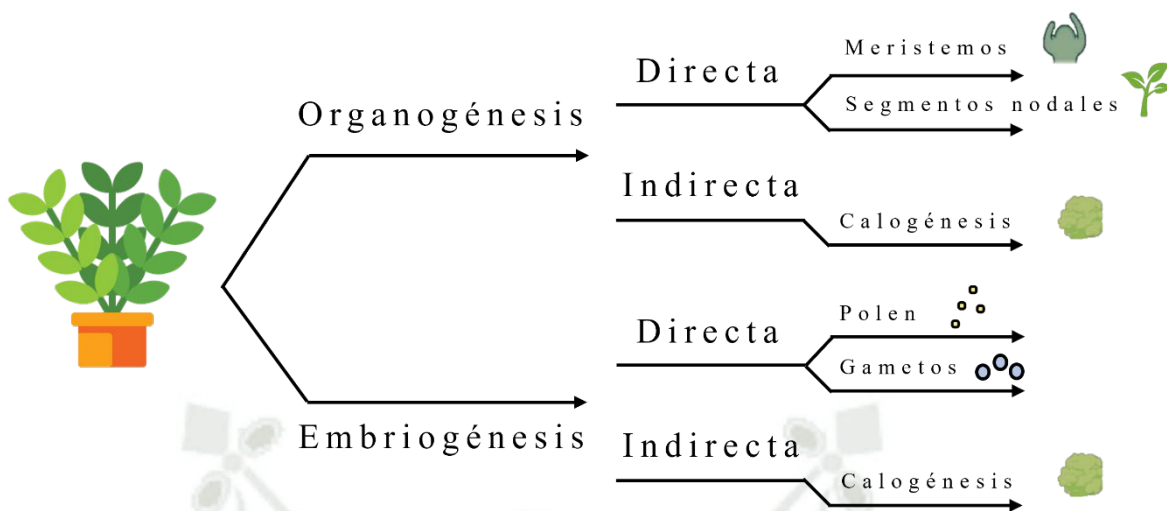


Figura 35. Vías del cultivo in vitro.

Nota: Elaboración propia

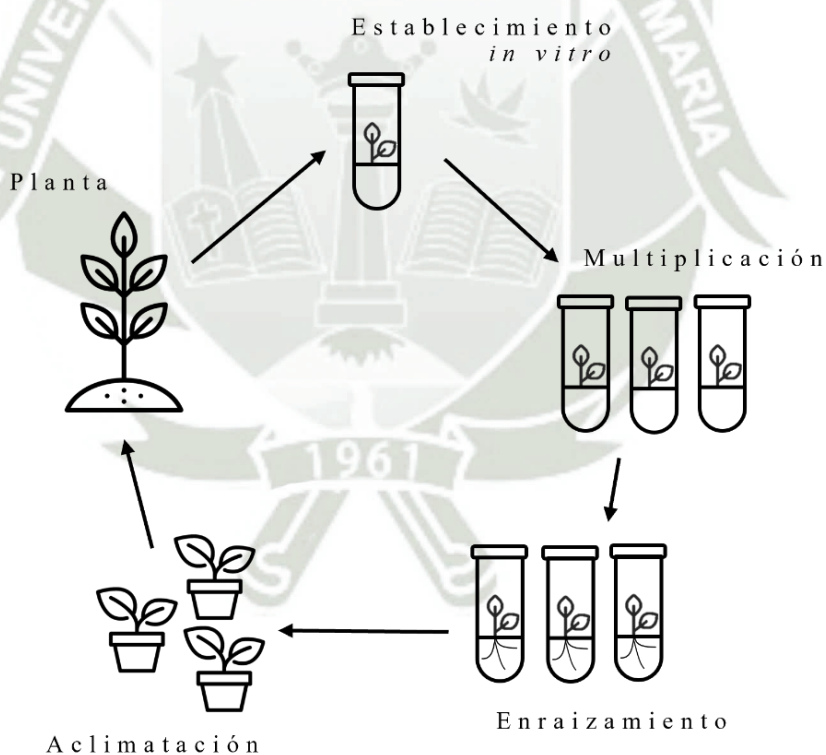


Figura 36. Fases de la micropropagación.

Nota: Elaboración propia

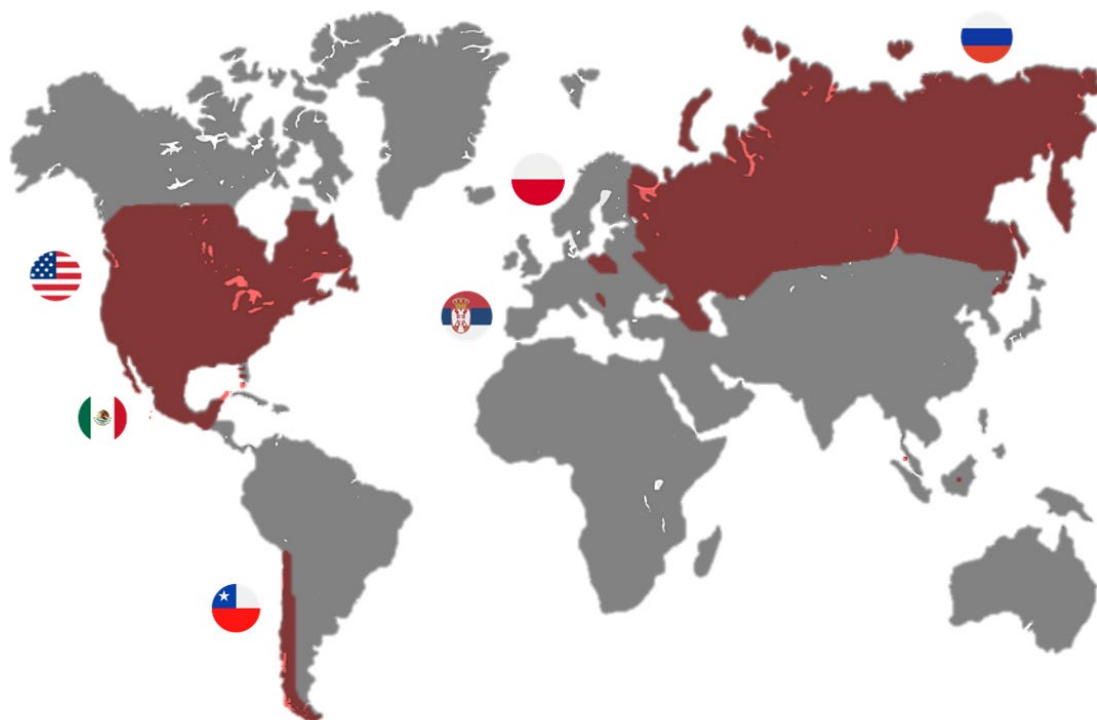


Figura 37. Principales países productores de frambuesa.

Nota: Elaboración propia