



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA PROPAGACIÓN IN VITRO DE *Vaccinium corymbosum* (ARÁNDANO AZUL) EMPLEANDO LA TÉCNICA DE INMERSIÓN TEMPORAL EN BIORREACTORES EN EL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES LEPLANT DE LA CIUDAD DE AMBATO

Trabajo de Titulación

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORAS: JANINA XIMENA GOYES TIXI

YANIRA NATHALY ROJAS BUENAÑO

DIRECTORA: Ing. ANA RAFAELA PACURUCU REYES MSc.

Riobamba – Ecuador

2021

©2021, Janina Ximena Goyes Tixi & Yanira Nathaly Rojas Buenaño

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Nosotras, Janina Ximena Goyes Tixi & Yanira Nathaly Rojas Buenaño, declaramos que el presente Trabajo de Titulación es de nuestra autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autoras asumimos la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Titulación; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 17 de septiembre de 2021



Janina Ximena Goyes Tixi
C.I. 0202133252



Yanira Nathaly Rojas Buenaño
C.I.160046868-8

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El Trabajo de Titulación; Tipo: Proyecto de Investigación, **ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA PROPAGACIÓN IN VITRO DE *Vaccinium corymbosum* (ARÁNDANO AZUL) EMPLEANDO LA TÉCNICA DE INMERSIÓN TEMPORAL EN BIORREACTORES EN EL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES LEPLANT DE LA CIUDAD DE AMBATO**, realizado por las señoritas: **JANINA XIMENA GOYES TIXI** y **YANIRA NATHALY ROJAS BUENAÑO**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Ing. Ana Rafaela Pacurucu Reyes, MSc. PRESIDENTE DEL TRIBUNAL	 ANA RAFAELA PACURUC U REYES	2021-09-17
Ing. Norma Soledad Erazo Sandoval, PhD. DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	 Firmado electrónicamente por: NORMA SOLEDAD ERAZO SANDOVAL	2021-09-17
Ing. Juan Carlos González García, MSc. MIEMBRO DE TRIBUNAL	 Firmado electrónicamente por: JUAN CARLOS GONZALEZ GARCIA	2021-09-17

DEDICATORIA

Quiénes seríamos nosotros si no tuviéramos delante personas que guían nuestro camino, aquellas que nos han tomado de la mano y jamás nos han soltado, las mismas que con una palabra nos motivan hacer mejores seres humanos, esas personas que tenemos en nuestra vida gracias a la bendición de Dios y que jamás quisiéramos perder. Este trabajo, que para mí representa esfuerzo, perseverancia y determinación se lo dedico a esas personas, las mejores personas de mi vida, mi padre Rodrigo quien ha sido mi ejemplo de constancia, firmeza y valentía, mis hermanas Melina e Irina quienes son mis cómplices y el espejo en el cual hoy me reflejo y sobre todo al amor de mi vida, mi madre María del Carmen quien hoy brilla en el esplendor del cielo y que gracias a su amor perfecto, su apoyo incondicional y su sabio consejo, he llegado a convertirme en la mujer que soy. Les prometo que cada paso que dé será llevando en mi mente y corazón todas sus enseñanzas para que en cualquier lugar en donde estén se sientan orgullosos de mí.

Los amo siempre.

Janina.

A mis padres, Manuel y Janneth, que sin duda alguna son mi ejemplo de vida, tanto en trabajo, perseverancia y amor,

A mis hermanos Alexander, Dayanara y Andrés, de los cuales nunca faltó un consejo presto para cualquier momento, en fin, a mi familia por creer en mí y nunca dejarme caer, por ser el pilar fundamental y la motivación más grande en mi vida.

Yanira.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos en primer lugar a Dios por permitirnos llegar a este momento que nos impulsa a continuar con nuestra vida profesional. De igual forma agradecemos a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo el brindarnos la formación académica necesaria para desarrollarnos eficazmente en nuestra profesión, extendemos nuestro agradecimiento a cada uno de los docentes que supieron brindarnos su conocimiento, paciencia y buenos valores a lo largo de este camino y de forma especial a la Dra. Norma Erazo y al Ing. Juan Carlos González por su guía en el Trabajo de Titulación.

Gracias a nuestras familias y amigos quienes fueron el motor principal de nuestro caminar por la universidad y nuestra mayor fortaleza en los tiempos difíciles.

Finalmente agradecemos a la empresa LePlant por permitirnos ser parte de su equipo de trabajo, brindarnos todas las facilidades y sobre todo agradecemos a la Ingeniera M.Sc., Paola Rivera por todo el apoyo ofrecido a lo largo de la investigación.

Janina & Yanira.

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICES DE GRÁFICOS.....	XI
ÍNDICE DE ANEXOS.....	XII
RESUMEN.....	XIII
SUMMARY.....	XIV
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO.....	4
1.1. Antecedentes.....	4
1.2. Bases Teóricas.....	5
1.2.1. Propagación in vitro.....	5
1.2.2. Pasos en la Micropropagación in vitro.....	7
1.2.2.1. Establecimiento del cultivo aséptico.....	7
1.2.2.2. Multiplicación.....	7
1.2.2.3. Enraizamiento de los brotes.....	7
1.2.2.4. Aclimatación.....	8
1.2.3. Métodos de multiplicación in vitro.....	8
1.2.3.1. Convencional.....	8
1.2.3.2. SIT.....	9
1.2.4. Vaccinium corymbosum (Arándano azul).....	13
1.2.5. Arándano en el Ecuador.....	14
1.2.6. Mercado Internacional.....	15
1.2.7. Multiplicación del Arándano.....	15
1.2.8. Vermicompostaje.....	15
1.2.8.1. Ventajas.....	16
1.2.8.2. Desventajas.....	16
1.2.9. Desarrollo Sostenible.....	17
1.2.10. Economía Circular.....	17
1.3. Bases conceptuales.....	18

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	20
2.1.	Localización del Estudio	20
2.2.	Tipo de Investigación	20
2.3.	Diseño de la Investigación	20
2.4.	Hipótesis	20
2.4.1.	<i>Hipótesis Nula</i>	20
2.4.2.	<i>Hipótesis de Trabajo</i>	20
2.5.	Identificaciones variables	21
2.5.1.	<i>SIT-VARIABLES Dependientes</i>	21
2.5.2.	<i>SIT-VARIABLES Independientes</i>	21
2.5.3.	<i>SIT-VARIABLES Interviniente</i>	21
2.6.	Población de estudio	21
2.7.	Tamaño de la muestra	21
2.8.	Método de muestreo	21
2.9.	Técnicas de recolección de datos	22
2.9.1.	<i>Determinación de la Tasa de Velocidad de Multiplicación</i>	22
2.9.2.	<i>Determinación del Coeficiente de Multiplicación</i>	22
2.9.3.	<i>Determinación de parámetros de control y calidad del compostaje</i>	23
2.10.	Propagación in vitro de <i>Vaccinium corymbosum</i>	23
2.10.1.	<i>Desinfección</i>	23
2.10.2.	<i>Introducción</i>	24
2.11.	Implementación del SIT en Biorreactores en la empresa LePlant	24
2.11.1.	<i>Biorreactores en frascos gemelos de vidrio</i>	24
2.11.2.	<i>Biorreactores en frascos cuadrados para laboratorios</i>	26
2.11.3.	<i>Programación y Automatización del SIT</i>	27
2.12.	Desinfección y Esterilización del SIT en Biorreactores	28
2.13.	Pruebas de contaminación	29
2.14.	Selección del material vegetal	30
2.15.	Preparación del medio de cultivo definitivo	30
2.16.	Siembra de los explantes en los Biorreactores	31
2.17.	Puesta en marcha del proceso	31
2.18.	Elaboración del Vermicompostaje	31
2.18.1.	<i>Construcción de las cajas de compostaje</i>	31
2.18.2.	<i>Recolección del material</i>	32
2.18.3.	<i>Montaje de las cajas de compostaje</i>	32

CAPÍTULO III

3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
3.1.	Introducción de <i>Vaccinium corymbosum</i>	34
3.2.	Implementación del SIT en Biorreactores en la empresa LePlant	34
3.3.	Pruebas de contaminación	36
3.4.	Fase de Experimentación	37
3.5.	Análisis Estadístico	40
3.5.1.	<i>Modelo Estadístico</i>	41
3.5.2.	<i>Comparación de las variables respuesta y los tratamientos</i>	41
3.5.2.1.	<i>Variable respuesta Longitud Final</i>	42
3.5.2.2.	<i>Variable respuesta Número de explantes</i>	42
3.5.3.	<i>ANOVA para el Número de Explantes</i>	42
3.5.4.	<i>ANOVA para la Longitud Final</i>	43
3.5.5.	<i>Comprobación de los Supuestos</i>	44
3.5.6.	<i>Variables Indicadoras</i>	45
3.5.6.1.	<i>Largo de Brotes</i>	45
3.5.6.2.	<i>Tasa de Multiplicación</i>	46
3.5.6.3.	<i>Coeficiente de Multiplicación</i>	46
3.5.6.4.	<i>Comprobación de Supuestos</i>	46
3.5.7.	<i>Vigorosidad</i>	48
3.5.8.	<i>Tasa de Multiplicación en Biorreactores versus el proceso convencional</i>	49
3.5.9.	<i>Vermicompostaje</i>	50
	CONCLUSIONES	52
	RECOMENDACIONES	53
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Matriz de Composición de los medios de cultivo MS (Murashige y Skoog) y WPM (Lloyd y McCown) empleado para especies leñosas.....	6
Tabla 1-2:	Matriz de recolección de datos.....	22
Tabla 2-2:	Matriz de programación del Proceso.....	28
Tabla 1-3:	Matriz de las pruebas de contaminación realizadas en los SIT de frascos gemelos de vidrio.....	36
Tabla 2-3:	Matriz de las pruebas de contaminación realizadas en los SIT de frascos cuadrados para laboratorio GL 80.....	37
Tabla 3-3:	Matriz de estadísticos.....	37
Tabla 4-3:	Matriz de resultados obtenidos en los tres ensayos en la fase de multiplicación de los Sistemas de Inmersión Temporal en un ciclo de 25 días	40
Tabla 5-3:	Matriz de variables respuesta	41
Tabla 6-3:	Matriz ANOVA teórica.....	43
Tabla 7-3:	Matriz de resultados para el ANOVA del Número de Explantes	43
Tabla 8-3:	Matriz de resultados para el ANOVA de la Longitud Final	43
Tabla 9-3:	Matriz de las Variables Indicadoras	45
Tabla 10-3:	Matriz de resultados para el ANOVA de la Longitud de Brotes	45
Tabla 11-3:	Matriz de resultados para el ANOVA de la Tasa de Multiplicación	46
Tabla 12-3:	Matriz de resultados para el ANOVA del Coeficiente de Multiplicación	46
Tabla 13-3:	Matriz de resultados de parámetros de calidad del abono orgánico.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1:	Propagación in vitro - Tecnología	6
Figura 2-1:	Propagación in vitro convencional de plantas.....	8
Figura 3-1:	Sistema de Inmersión Temporal “RITA”	10
Figura 4-1:	Sistema de Inmersión Temporal “Ebb-Flow”	10
Figura 5-1:	Sistema de Inmersión Temporal “Thermo-Photo-Bioreactor”	11
Figura 6-1:	Sistema de Inmersión Temporal “Rocker”	11
Figura 7-1:	Sistema de Inmersión Temporal “Twin Flaks”	12
Figura 8-1:	Arándano azul (<i>Vaccinium corymbosum</i>).....	14
Figura 9-1:	Vermicompostaje	16
Figura 1-2:	Proceso de Desinfección.....	23
Figura 2-2:	Introducción de <i>Vaccinium corymbosum</i>	24
Figura 3-2:	Biorreactores en frascos gemelos de vidrio	25
Figura 4-2:	Unión de los biorreactores de frascos gemelos	25
Figura 5-2:	Biorreactores del Sistema de Inmersión Temporal	26
Figura 6-2:	Biorreactores del SIT conectados a las electroválvulas	27
Figura 7-2:	Programación SIT 1	27
Figura 8-2:	Programación SIT 2	27
Figura 9-2:	Desinfección SIT 1	28
Figura 10-2:	Desinfección SIT 2	28
Figura 11-2:	Pruebas de contaminación en los biorreactores gemelos	29
Figura 12-2:	Pruebas de contaminación en los biorreactores cuadrados GL 80	29
Figura 13-2:	Selección de explantes.....	30
Figura 14-2:	Preparación del medio de cultivo	30
Figura 15-2:	Siembra de los explantes en los biorreactores	31
Figura 16-2:	Picado de residuos vegetales	32
Figura 17-2:	Preparación de la cama para las lombrices	32
Figura 18-2:	Incorporación de los residuos vegetales al proceso	33
Figura 19-2:	Bandeja de recolección de lixiviados	33
Figura 1-3:	Proceso de Introducción de <i>Vaccinium corymbosum</i>	34
Figura 2-3:	Implementación del SIT en los frascos gemelos de vidrio.....	35
Figura 3-3:	Implementación del SIT en los frascos cuadrados GL 80.....	36
Figura 4-3:	Resultados del Sistema de Inmersión Temporal 1	38
Figura 5-3:	Resultados del Sistemas de Inmersión Temporal 2.....	39
Figura 6-3:	Unidades biológicas en el tiempo de inmersión.....	40
Figura 7-3:	Unidades Biológicas en fase de Multiplicación	48

ÍNDICES DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3:	Gráfico de cajas de la Longitud inicial de los explantes.....	37
Gráfico 2-3:	Histograma de Frecuencias de la comparación de variables respuestas y tratamientos	41
Gráfico 3-3:	Gráfico de cajas de la Comparación de los tratamientos	42
Gráfico 4-3:	Gráfico de la comprobación del Supuesto de Normalidad	44
Gráfico 5-3:	Gráfico de la comprobación del Supuesto de Homocedasticidad	44
Gráfico 6-3:	Gráfico de cajas de la comparación de los tratamientos	45
Gráfico 7-3:	Gráfico de comprobación del Supuesto de Normalidad del ANOVA de las variables indicadoras.....	46
Gráfico 8-3:	Gráfico de comprobación del Supuesto de Homocedasticidad del ANOVA de las variables indicadoras.....	47
Gráfico 9-3:	Gráfico de barras de la Vigorosidad de los explantes sometidos al Tratamiento 1 y al Tratamiento 2 respectivamente	49
Gráfico 10-3:	Gráfico de barras de la comparación de la Tasa de Multiplicación de los Sistemas de Inmersión Temporal y el proceso convencional	49

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** AVAL DE LA INVESTIGACIÓN
- ANEXO B:** MATRIZ DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ENSAYO UNO, EN LA FASE DE MULTIPLICACIÓN EN EL SIT 1
- ANEXO C:** MATRIZ DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ENSAYO DOS, EN LA FASE DE MULTIPLICACIÓN EN EL SIT 1
- ANEXO D:** MATRIZ DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ENSAYO TRES, EN LA FASE DE MULTIPLICACIÓN EN EL SIT 1
- ANEXO E:** MATRIZ DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA FASE DE MULTIPLICACIÓN EN EL SIT 2
- ANEXO F:** MATRIZ DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ENSAYO DOS, EN LA FASE DE MULTIPLICACIÓN EN EL SIT 2
- ANEXO G:** MATRIZ DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ENSAYO TRES, EN LA FASE DE MULTIPLICACIÓN EN EL SIT 2
- ANEXO H:** REGISTRO FOTOGRÁFICO
- ANEXO I:** ANÁLISIS QUÍMICO DEL VERMICOMPOST

RESUMEN

En la presente investigación se estandarizó un protocolo para la propagación *in vitro* de arándano azul (*Vaccinium corymbosum*) en la empresa LePlant. Inicialmente se empleó Sistemas de Inmersión Temporal en Biorreactores (SIT) en frascos cuadrados para laboratorio GL 80, en los cuales se realizaron pruebas de funcionamiento y contaminación, posteriormente se expusieron veinte explantes a dos tratamientos, Tratamiento 1 (1min/4h-250ml) y Tratamiento 2 (3min/6h-300ml), por un período de veinticinco días y tres réplicas biológicas. Una vez obtenidos los valores promedio de la tasa de multiplicación al emplear SIT, se comparó estadísticamente con el reportado en la empresa. Al finalizar la experimentación los residuos orgánicos se sometieron a una degradación biológica por medio de vermicompostaje. Después, mediante el software RStudio se determinó con un nivel de significancia de 0.05 y un 95% de confianza que el Tratamiento 1 es mucho más efectivo que el Tratamiento 2 en cuanto a largo de brotes, tasa y coeficiente de multiplicación evidenciándose que la frecuencia y tiempo de inmersión son directamente proporcionales, al tiempo se dedujo también que la tasa de multiplicación de 3.4 obtenida en los SIT, se incrementó aproximadamente al doble del valor registrado en el empresa (1.8) en el proceso *in vitro* convencional. Con relación al análisis químico del vermicompost presentó una buena relación C/N y un alto contenido de materia orgánica, siendo óptimo para su uso como suplemento de sustratos. Al finalizar la experimentación, se estandarizó un protocolo para la propagación *in vitro* del de arándano azul empleando la técnica de Inmersión Temporal en Biorreactores donde a menor volumen, tiempo y frecuencia de inmersión se mejora la absorción de nutrientes garantizando una alta tasa de multiplicación. Se recomienda en lo posterior trabajar con unidades biológicas procedentes de cultivos sanos.

Palabras clave: <BIOTECNOLOGÍA>, <ARÁNDANO AZUL (*Vaccinium corymbosum*)>, <SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL EN BIORREACTORES (SIT)>, <TASA DE MULTIPLICACIÓN>, <BIORREACTORES>.

LEONARDO
FABIO
MEDINA
NUSTE

Firmado digitalmente por LEONARDO FABIO MEDINA NUSTE
Fecha: 2021.10.22 11:42:23 -05'00'



1818-DBRA-UTP-2021

SUMMARY

The aim of the current research was the standardization of a protocol for the blueberry (*Vaccinium corymbosum*) in vitro propagation at LePlant company. First of all, Temporary Immersion Systems in Bioreactors (TIS) were used in GL 80 square laboratory flasks, in which operation and contamination tests were carried out; then, twenty explants were put under two treatments, Treatment 1 (1min / 4h-250ml) and Treatment 2 (3min / 6h-300ml) during a twenty five-day period and three biological replications. Once the multiplication rate average values were obtained with the use of TIS, it was possible to compare these values in a statistical way with the ones reported by the company. At the end of the experimentation, the organic waste was put under a biological degradation through the use of vermicomposting. Then, with the use of RStudio software, it was possible to determine a significance level of 0.05 and a confidence of 95% regarding the effectiveness of Treatment 1 over Treatment 2 in terms of sprouts length, rate and multiplication coefficient, this reflects that the frequency and Immersion time are directly proportional, it was also concluded that the multiplication rate of 3.4 obtained in the Temporary Immersion Systems, increased approximately twice the value of 1.8 registered in the company during the conventional in vitro process. With regard to the vermicompost chemical analysis, it presented a good C/N ratio as well as a high organic matter content, optimal for being used as substrate supplement. At the end of the experimentation, a protocol for the blueberry in vitro propagation was standardized with the use of the Temporary Immersion technique in Bioreactors where the lower volume, time and immersion frequency, the best absorption of nutrients guaranteeing a high multiplication rate. Thus, a further work with biological units from healthy crops is recommended.

Keywords: <BIOTECHNOLOGY>, <BLUEBERRY (*Vaccinium corymbosum*)>, <TEMPORARY IMMERSION SYSTEMS IN BIOREACTORS (TIS)>, <MULTIPLICATION RATE>, <BIORREACTORS>.

INTRODUCCIÓN

La empresa LePlant se ha dedicado por varios años a la micropropagación de tejidos vegetales empleando diversas técnicas del cultivo *in vitro*, lo que permite obtener una planta completa a partir de una parte de la planta madre con el fin de que manifieste su totipotencia y sobre todo conservando sus características génicas. En la actualidad ha surgido el interés y la necesidad de mejorar la tasa de multiplicación de 1.8 % de la especie *Vaccinium corymbosum* (arándano azul) generada en la empresa por el método convencional *in vitro*, debido a la creciente demanda que posee el fruto dentro del mercado nacional como internacional por los grandes beneficios en la salud, que presentan sus características nutricionales y a su vez que se trata de un producto muy rentable (Egas, 2018, párr.2), de igual forma se busca disminuir el empleo de un agente gelificante para alcanzar la solidificación del medio de cultivo, ya que incrementa los precios y origina una mayor inversión.

Considerando la problemática con respecto a la tasa de producción de esta especie en la empresa, con este estudio se pretende instaurar a los Sistemas de Inmersión Temporal en biorreactores como una herramienta importante dentro del cultivo *in vitro* para solventar las deficiencias generadas en el proceso habitual. Según estudios realizados por (Zúñiga et al., 2009, pp.23-29) se expone que mediante esta técnica se han obtenido mayores tasas de multiplicación a comparación del proceso convencional *in vitro*, el mismo que se emplea usualmente en la empresa, al mismo tiempo se genera un mayor contacto de la materia vegetal con el medio de cultivo, mejora el intercambio gaseoso, disminuye los costos de producción al emplear un medio de cultivo líquido y aumenta el porcentaje de enraizamiento y sobrevivencia de las plantas en la fase de aclimatación.

Pese a que el arándano azul, es de cultivo reciente en el país, el Ecuador cuenta con grandes ventajas en el mercado para la producción de esta especie anual, gracias a las condiciones medioambientales que presenta sobre todo la luminosidad brindada por la línea ecuatorial que influye positivamente en el tamaño y los grados brix (dulzura) del fruto. Según la *Food and Drug Administration (FDA)*, el arándano azul es de gran interés y consumo a nivel internacional por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antitrombóticas, y por su empleo en la elaboración de jaleas y jarabes. Es por lo mencionado anteriormente que la empresa LePlant busca mejorar sus procesos de multiplicación para contribuir con la agricultura y el desarrollo comercial del país. Ser una empresa sostenible encaminada hacia una economía circular, es otro de los objetivos de LePlant, es por ello por lo que el estudio a su vez pretende determinar la viabilidad de aprovechar los 2,5 a 3 kg de residuos vegetales generados semanalmente para producir un abono orgánico que será empleado en otra línea de producción de esta sociedad.

Formulación del problema

¿La estandarización de un protocolo para la micropropagación *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* empleando Sistemas de Inmersión Temporal en biorreactores es viable para mejorar la tasa de multiplicación de esta especie en la empresa LePlant de la ciudad de Ambato?

Justificación de la investigación

Los motivos por los cuales se decide investigar sobre la micropropagación *in vitro* de arándano utilizando la técnica de inmersión temporal en biorreactores se centran en que la empresa LePlant requiere incrementar sus niveles de producción y mejorar la eficiencia de sus procesos debido al incremento de la demanda del arándano azul en el mercado. Según datos recolectados por (Winkelmann et al., 2006, pp.319–327), en biorreactores, la obtención de plántulas reduce los costos de producción entre un 50 y 60 % y además (Ángel-Molina et al., 2018, pp.48–57), indican que la micropropagación *in vitro* se realiza en ambientes completamente limpios lo que permite obtener cultivos en ausencia de plagas y enfermedades. Al mismo tiempo de brindar una mayor optimización biológica por los altos coeficientes de multiplicación, el empleo de un medio de cultivo líquido en el sistema según (Adelberg, 2004, pp.245–250), genera un bajo costo.

El aprovechamiento de los residuos vegetales del proceso de propagación *in vitro* en la empresa LePlant busca fomentar una cultura de sostenibilidad enfocada en la economía circular, la cual según la Comisión Europea se define como un modelo en el que “*el valor de los productos, los materiales y los recursos se mantenga en la economía durante el mayor tiempo posible, y en la que se reduzca al mínimo la generación de residuos*”. La idea de “cerrar el círculo” requiere aprovechar este remanente con la finalidad de producir un abono orgánico, el cual será utilizado en otra línea de producción de la empresa, lo que permitirá reducir el volumen de desechos generados por la misma y mejorará significativamente su imagen. Gracias a la empresa LePlant, único laboratorio certificado por Agrocalidad de propagación *in vitro* del centro del país, dedicado a la investigación y desarrollo científico y tecnológico se llevará a cabo este proyecto.

Objetivos de la investigación

Objetivo General

- Estandarizar un protocolo para la propagación *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* (Arándano azul) empleando la técnica de inmersión temporal en biorreactores.

Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto que tiene la relación entre la frecuencia y el tiempo de inmersión.
- Comparar la tasa de multiplicación de *Vaccinium corymbosum* (Arándano biloxi) obtenida en el proceso in vitro convencional en contraste con el sistema de inmersión temporal.
- Determinar la viabilidad de emplear los residuos vegetales del proceso para generar un vermicompost.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes

La propagación vegetativa *in vitro* ha tomado un gran valor en cuanto a la producción masiva de plantas puesto que involucra una serie de beneficios como acortar los ciclos reproductivos, evitar la generación de enfermedades y difusión de plagas, incrementar las tasas de multiplicación y sobre todo mejorar la calidad de las plantas juntamente con su producción. Las fases del proceso de propagación *in vitro* convencional implica el uso de diferentes medios de cultivo como sólidos, semisólidos y líquidos; generalmente se solidifica el medio con agar u otro agente gelificante para brindar un soporte a las plantas (Castillo et al., 2020, pp.175–176), pero en base a varios estudios realizados se ha determinado que el empleo de medios de cultivo líquidos abarca una serie de ventajas importantes, (Adelberg, 2004, pp.245–250), destaca el mejoramiento de la difusión de nutrientes y agua, disminución de impurezas causadas por el uso de agar o agente solidificante, bajo costo, preparación del medio en un periodo corto de tiempo y el uso eficiente del espacio en el cuarto de crecimiento.

Entre los sistemas de cultivos *in vitro* que emplean medios líquidos encontramos a los sistemas sumergidos, que son modificaciones de los fermentadores usados para el crecimiento de microorganismos y los de inmersión temporal, que son más simples puesto que son sistemas mecánicos; para llevar a cabo estos procesos una de las técnicas usadas es la de inmersión temporal que se fundamenta en el empleo de flujos de aire a presión que mueven los fluidos entre reservorios y frascos de cultivo. Steward et al. (1952, pp. 57–79) fue la primera persona en emplear una técnica de inmersión periódica en medios de cultivo líquido, donde la innovación que se realizó en 1956 fue llamada como “los aparatos Steward”. En este sistema el medio líquido era trasladado de un tubo a otro sistema, manteniendo al tejido en una fase gaseosa y viceversa, no fue hasta 1985 que Tisserat y Vandercook pusieron en marcha el primer equipo automatizado que utilizaba este principio. En los SIT, la planta entra en contacto con el medio líquido con cierta frecuencia durante un período de tiempo corto evitando la hiperhidricidad generada comúnmente en los sistemas de contacto (Castillo et al., 2020, pp.175–176).

Como afirman Cohen (1980, pp.144-146); Frett y Smagula (1983, pp.467–472), los arándanos se han micropropagado durante mucho tiempo a partir de segmentos nodales de plantas adultas cultivadas en el campo, la propagación *in vitro* de estas plantas se ha visto limitada por los costos de producción generados por las diversas manipulaciones en las etapas de este proceso, varios autores han propuesto la automatización de la micropropagación en biorreactores como una posible forma de reducir los costos e incluso promover fuertemente la rápida multiplicación y un

control máximo de las condiciones del microambiente (Ross y Castillo, 2009, pp.1-8). El interés de producir arándano azul radica en su alto contenido de antioxidantes, los compuestos que previenen una reacción química de oxidación que puede dañar o matar a las células causando una serie de enfermedades; además de abarcar estos beneficios en cuestión de salud (González, 2018, párr.18), esta fruta es de interés internacional ya que, según Raúl Olivares, gerente de la empresa chilena Driscoll's, comercializadora de arándano, el consumo de este producto está creciendo cerca de un 20% anual.

A nivel mundial Hoornweg y Bhada-Tata (2012, pp.1-15), afirman que alrededor del 46% de los residuos sólidos son de carácter orgánico, las alternativas que se han establecido para su aprovechamiento están basadas en la reutilización y reciclaje donde se pretende recuperarlos para que así sean incluidos nuevamente en la cadena productiva (Chavez y Rodriguez, 2016, pp.90-107). El incremento de la población generó que la gestión o tratamiento de estos residuos sea más difícil a comparación de tiempos pasados; al hablar de residuos, en general se los toma como elementos "inservibles" pero en su mayoría estos pueden ser utilizados para producir otros bienes, los residuos vegetales son considerados un potencial de vida puesto que son biodegradables y su descomposición natural reutilizando sus propiedades nutritivas, es factible.

Los residuos vegetales generados en la micropropagación *in vitro* pueden ser utilizados para generar abono orgánico, el compostaje es la mejor opción para realizarlo ya que ha sido utilizado desde años anteriores a la Primera Guerra Mundial por Albert Howard, quien es considerado su inventor (Tortosa, 2019, párr.2), consiste en la descomposición biológica del material orgánico en condiciones aeróbicas, transformándolos en CO₂, energía térmica y materia orgánica estabilizada, rica en sustancias húmicas. Este proceso puede ser mediado tanto por microorganismo, lombrices o su combinación.

La lombricultura es una actividad de reciente creación, la cual se creó a mediados del siglo XX, y su relevancia como proceso para estabilización de residuos orgánicos se da en los años setenta, el vermicompostaje es el proceso que combina el poder de degradación bioquímica de la materia orgánica por parte de los microorganismos y la facilidad de fragmentación y acondicionamiento de las lombrices que actúan como conductores del proceso (Villegas y Canepa, 2017, pp.394).

1.2. Bases Teóricas

1.2.1. Propagación in vitro

La micropropagación es el conjunto de procesos que emplea varias técnicas de cultivo *in vitro* para la obtención masiva de plantas, esta técnica es aprovechada para regenerar una planta totalmente completa conservando las características genéticas de la planta madre (totipotencia). El objetivo principal es la multiplicación de plantas asexual desde fragmentos de ellas como

meristemas, esquejes, brotes, hojas entre otros, otro rasgo beneficiario es la sanitización de esta, ya que se encuentra libre de patógenos como virus, hongos y otros agentes (Ángel-Molina et al., 2018, pp.48–57).



Figura 1-1: Propagación in vitro - Tecnología

Fuente: (LePlant, 2021, p.1).

Con el presente mecanismo se alcanza la multiplicación en menor tiempo, menos recursos y a gran escala en comparación a las obtenidas en campo, en efecto, se estima que 1 ha de plantas en campo representa a 1 m^2 de material vegetal en el laboratorio, ligado a que posee una tasa exponencial de crecimiento y con características semejantes. En el siguiente cuadro se detallan los medios basales, más usados en el cultivo de tejidos vegetales:

Tabla 1-1: Matriz de Composición de los medios de cultivo MS (Murashige y Skoog) y WPM (Lloyd y McCown) empleado para especies leñosas

Compuesto	MS mg/l (mM)	WPM mg/l (mM)
Macro nutrientes		400 (4.9)
NH₄NO₃	1650 (20.6)	-----
KNO₃	1900 (18.8)	370 (1.5)
MgSO₄·7H₂O	370 (1.5)	96 (0.65)
CaCl₂·2H₂O	440 (2.99)	170 (1.25)
KH₄PO₄	170 (1.25)	556 (2.35)
Ca(NO₃)₄H₂O	-----	-----
K₂SO₄	-----	-----
Micro nutrientes		
KI	0.83 (0.005)	-----
H₃BO₃	6.2 (0.1)	6.2 (0.19)
MnSO₄·4H₂O	22.3(0.13)	22.3 (0.13)
ZnSO₄·7H₂O	8.6 (0.0029)	8.6 (0.029)
Na₂MoO₄·2H₂O	0.25 (0.01)	0.25 (0.01)
CuSO₄·5H₂O	0.025 (0.0001)	0.25 (0.001)
CoCl₂·6H₂O	0.025 (0.0001)	-----
Na₂EDTA	37.3 (0.1)	37.3 (0.1)
FeSO₄·7H₂O	27.8 (0.1)	27.8 (0.1)

Fuente: (Quintero-García y Jaramillo-Villegas, 2012, pp.52-60).

Realizado por: Goyes Janina & Rojas Yanira, 2021.

1.2.2. Pasos en la Micropropagación in vitro

En investigaciones previas Murashige y Skoog (1962, pp. 473–497) mencionan la existencia de ciertas fases fundamentales del proceso que conllevan a la micropropagación eficiente de una especie:

1.2.2.1. Establecimiento del cultivo aséptico

Una vez se ha elegido el explante más adecuado, este tiene que ser desinfectado ya que existen una serie de microorganismos que pueden crecer en el medio de cultivo y competir con ventaja ante el explante; una gran variedad de soluciones se ha utilizado para este fin, pero más empleadas son las de hipoclorito de sodio o calcio, peróxido de hidrogeno, el cloro comercial, el alcohol a diferentes porcentajes. La selección y la concentración depende de las características del explante o por lo general se establecen experimentalmente por prueba y error, de los explantes seleccionados y previamente desinfectados, se procede a la inducción en el medio de cultivo adecuado (Roca y Mroginski, 1991, p.99).

1.2.2.2. Multiplicación

En esta etapa todos los brotes adventicios obtenidos de los tallos inducidos (planta madre o explante inicial) se individualizan o se multiplican, subcultivándose, para incrementar el número de plantas por explante; el crecimiento también puede deberse a la división de células, aumento de su tamaño o ambas situaciones, en el proceso de multiplicación se puede generar la formación de callos. Es importante recalcar que esta fase puede replicarse varias veces (Jiménez-Bonilla et al., 2018, pp. 144-159).

1.2.2.3. Enraizamiento de los brotes

El proceso de enraizamiento presenta gran relevancia ya que permite que la plántula desarrolle su sistema radicular, lo cual facilitará el trasplante y adaptación a condiciones ex vitro; esta etapa implica modificar la composición nutricional del medio de cultivo, como variar la concentración de sales, a su vez se requiere un balance hormonal en el cual se disminuye la concentración de citocinas y se aumenta la concentración de auxinas, dependiendo de la especie y variedad de cultivo (García et al., 2004, pp.30-42). Lo que se busca con este proceso es que los brotes tratados lleguen a inducir la formación de raíces y producir plántulas completas (Roca y Mroginski, 1991, pp.113-116).

1.2.2.4. Aclimatación

Es en teoría la fase más difícil del proceso ya que las plántulas salen del ambiente estéril con un medio de cultivo enriquecido a las condiciones externas (García et al., 2004, pp.30-42), según el criterio de varios autores en primer lugar se deben lavar cuidadosamente para retirar el agar puesto que puede ser un foco de contaminación, seguidamente se trasplantan a recipientes con suelo estéril y son cubiertas por fundas de polietileno, las cuales se van perforando gradualmente por 15 a 20 días con el fin de que las plántulas se adapten paulatinamente a las condiciones del invernadero. Finalmente se riega las plántulas con medio de cultivo diluido hasta pasar a soluciones menos complejas (Roca y Mroginski, 1991, pp.113-116).

1.2.3. Métodos de multiplicación *in vitro*

En relación a las técnicas que se usan para la micro propagación *in vitro* estas son una amplificación de lo que se conoce de los métodos vegetativos tradicionales, consecuentemente presentan varias ventajas como la disminución de espacio para la obtención de plantas, material vegetal de calidad, libres de patógenos, producción durante todo el año, mayor tasa de multiplicación, menor tiempo, (Georgieva et al., 2016, pp.46-51) desarrollándose en medios de cultivo líquido, SIT y semisólido (Azúa, 2017, pp.15-16).

1.2.3.1. Convencional

El cultivo *in vitro* conlleva la siembra dentro de frascos de vidrio empleando como sustrato un medio sólido comúnmente se utiliza agar, así mismo se maneja en un ambiente artificial que conlleva asepsia es decir ausencia de patógenos y se controla varios factores que inciden en su crecimiento, implica alta mano de obra (Zapata, 2014, p.56).



Figura 2-1: Propagación *in vitro* convencional de plantas

Fuente: (Zapata, 2014, p.56).

1.2.3.2. SIT

Sistema de cultivo que viabiliza su empleo por la disminución de la mano de obra, automatización y reducción de costos de producción, fundamentalmente se basa en que pequeñas plántulas son introducidas en frascos con las características y los nutrientes apropiados para desarrollarse y multiplicarse satisfactoriamente, es decir; que los explantes seleccionados se sumergen en medios de cultivo líquidos por cortos periodos de tiempo que producen una masiva micropropagación *in vitro* (mayor número de plantas por unidad de área (Georgieva et al., 2016, pp.46–51). Siendo así el principio de funcionamiento la alternancia de períodos de sumergencia y de no sumergencia, parecido a marea baja y marea alta, puesto que el ajuste de estos tiempos de marea es una técnica efectiva para controlar el intercambio de gases y el desarrollo de los explantes (Werner et al., 2018, pp.15–22).

Los recipientes utilizados en esta técnica se denominan biorreactores puesto que permiten desarrollar todos los procesos biológicos necesarios para efectuar la división celular, fotosíntesis y otros procesos. Proveen una eficiente transferencia de oxígeno, que conforma un sistema de renovación periódica de gases internamente en el frasco beneficiando el desarrollo y crecimiento de los brotes, a su vez reduce la contaminación microbiana (Steingroewer et al., 2013, pp.26–38). Debnath (2017, pp.72–80) teniendo en cuenta que los explantes multiplicados y enraizados en los procesos convencionales de micropropagación *in vitro* se proliferan en un ambiente con humedad relativamente elevada, desarrollan estomas (estructuras reguladoras de las transpiración y pérdida de agua en la planta) que no son completamente funcionales en los descensos de humedad y por lo tanto no logran evitar la desecación de los explantes. Por lo mencionado anterior es que de forma tradicional el éxito de las vitro plantas radica en la aclimatación pero los Sistemas de Inmersión Temporal ofrecen una gran ventaja ante esta deficiencia puesto que las plantas propagadas por este método no requieren de la etapa de aclimatación o es muy corta (Etienne y Berthouly, 2002, pp.215–231); es por ello que si se compara con los métodos de propagación en medios de cultivo semisólido, donde, a consecuencia de la falta de intercambio gaseoso, la transición del estado *in vitro* a *ex vitro*, es mayor para disminuir la tasa de mortalidad de las vitroplantas (Arredondo, 2019, p.17).

A. Tipos de Sistemas de Inmersión Temporal

Existen varios sistemas de inmersión temporal, los cuales difieren en base a su estructura, diseño o intercambio de oxígeno, tales son:

- Sistema RITA: : consta de un recipiente de polipropileno autoclavable generalmente de 500 mL de volumen, consta de dos compartimientos separados por una bandeja con un soporte de malla y un tubo de plástico en el centro, el recipiente está cerrado por una tapa tipo tornillo

que tiene puertos externos centrales y laterales en la parte superior, estos contienen filtro de membrana para brindar esterilidad (Sinmaleza y Grijalva, 2018, p.19).

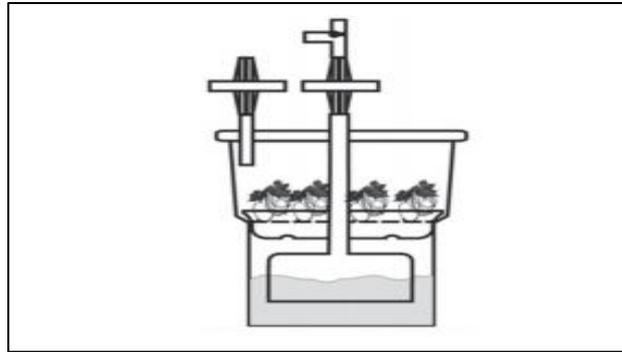


Figura 3-1: Sistema de Inmersión Temporal “RITA”

Fuente: (Sinmaleza y Grijalva, 2018, p.19).

- Sistema Ebb-Flow: son dos recipientes interconectados, uno de los recipientes alberga a los explantes manteniendo la humedad entre un 85-90% gracias a la espuma de poliuretano utilizada como soporte, el otro recipiente sirve de reservorio para el medio de cultivo y es más pequeño que el anterior. Este sistema es más utilizado en la acumulación de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro* (Sinmaleza y Grijalva, 2018, p.20).

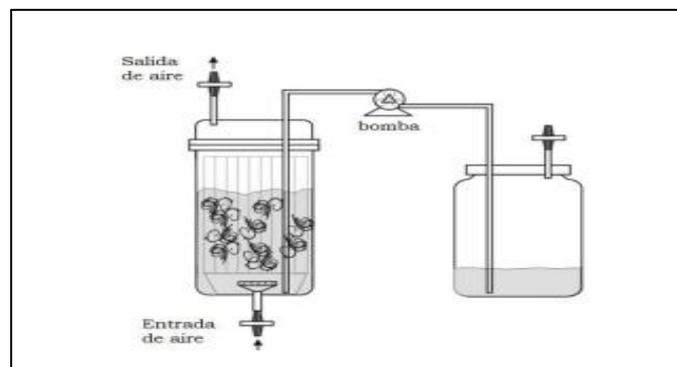


Figura 4-1: Sistema de Inmersión Temporal “Ebb-Flow”

Fuente: (Sinmaleza y Grijalva, 2018, p.20).

- Sistema Thermo-Photo-Bioreactor: consta de dos recipientes de vidrio interconectados entre sí por tubos de acero inoxidable, el recipiente superior es el contenedor del medio, este sistema consta de una camisa reguladora de la temperatura y una fuente de luz UV ubicada en la tapa superior. Una malla de acero inoxidable sirve como soporte para los explantes (Sinmaleza y Grijalva, 2018, p.21).

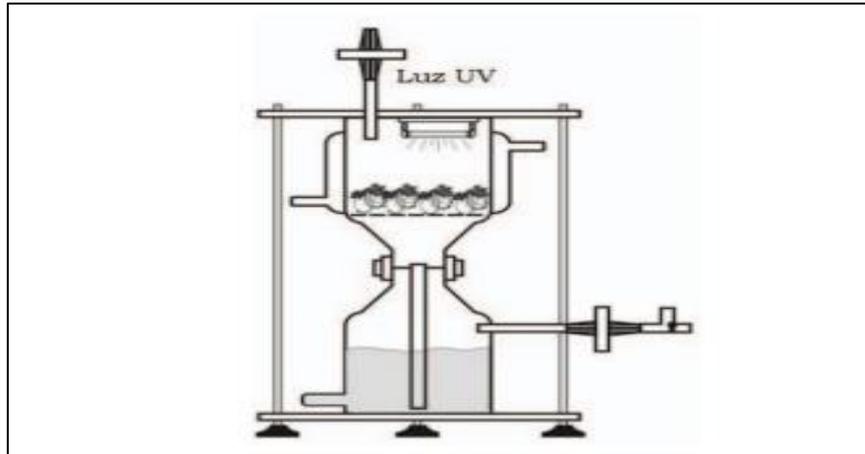


Figura 5-1: Sistema de Inmersión Temporal “Thermo-Photo-Bioreactor”

Fuente: (Sinmaleza y Grijalva, 2018, p.21).

- Sistema *Rocker*: son dos contenedores rectangulares de policarbonato, en su parte lateral posee un tapón para rosca que contiene una membrana para filtro. Su funcionamiento se basa en inclinaciones que permiten crear frentes de onda para emparar los explantes (Sinmaleza y Grijalva, 2018, p.22).

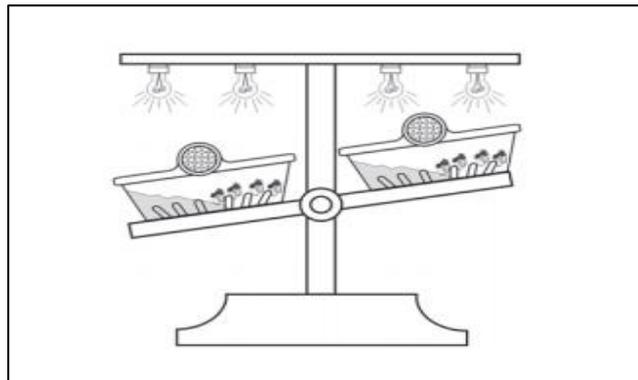


Figura 6-1: Sistema de Inmersión Temporal “Rocker”

Fuente: (Sinmaleza y Grijalva, 2018, p.22).

- El SIT Twin Flaks: consiste en dos recipientes (frascos o frascos de boca ancha), que se encuentran conectados cada uno entre sí por un tubo de silicón, vidrio o plástico en forma de U, que permite el traspaso del medio de cultivo en la frecuencia requerida (Sinmaleza y Grijalva, 2018, p.19). El frasco que contiene los explantes tiene la función de cámara de cultivo, en tanto el otro recipiente se emplea como tanque de acopio de medio. El recipiente de la cámara de cultivo puede contar o no con material de soporte para las plantas (perlas de vidrio, espuma de poliuretano, tamices) en su parte inferior. Cada recipiente está conectado a su propia línea de aire presurizado por un tubo, proporcionando la ventilación adecuada al mismo tiempo que se conecta a un compresor que suministra aire controlado por dos relojes temporizadores independientes, junto con válvulas solenoides de tres vías (Steingroewer et al., 2013, pp.26–38).

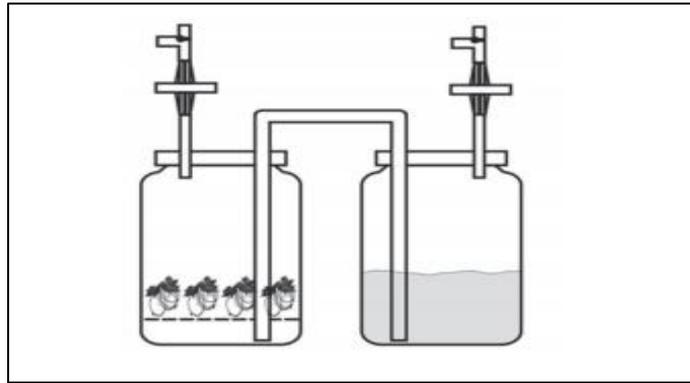


Figura 7-1: Sistema de Inmersión Temporal “Twin Flaks”

Fuente: (Sinmaleza y Grijalva, 2018, p.19).

El volumen del frasco es un factor relevante a la hora de la investigación tal es el caso que el gran tamaño de recipiente genera un efecto positivo en la propagación así pues no genera un hacinamiento de las plantas como sucede en los recipientes utilizados en los procedimientos convencionales, en definitiva, su tamaño ideal oscila desde 1 a 20 litros (Camposano y Ibarra, 2019, p.9). En cuanto al medio de cultivo, el idóneo es: Woody Plant Medium (WPM) + vitaminas + ácido ascórbico (2 mg/l) + sulfato de adenina (80mg/l) + sacarosa (20 gr/l) + Dimetilaminopurina 2ip (2 mg/l) con pH de 5,50 (Ross y Castillo, 2009, pp.1–8), antes de la esterilización en la autoclave, el volumen del medio líquido influye directamente en la tasa de multiplicación más aun cuando los grandes volúmenes conllevan a una disminución de la tasa de multiplicación es decir son menos eficientes. Con relación al ciclo de frecuencias y tiempo de inmersión para conseguir el crecimiento o multiplicación eficaz de los tejidos o embriones, los tiempos de exposición cortos de 1 min estimulan la producción de embriones somáticos todavía cabe señalar que se normaliza los periodos puesto que regulan la absorción de los nutrientes, atmosfera gaseosa y la manifestación de hiperhidratación así mismo el contacto del medio nutritivo con los explantes minimiza el nivel de toxinas presentes por consiguiente se conservan limpias de sus exudados que perjudican sus desarrollo. La oxigenación está ligada directamente con el balance nutricional, frecuencias y tiempos de inmersión para que el SIT tienda a ser más eficiente que la propagación convencional la cual no provee oxígeno suficiente. El cambio de atmósfera en la etapa final permite obtener una planta más corpulenta, con mejores características y por ende está mejor preparada para la etapa ex vitro de aclimatación y enraizamiento, en definitiva, se debe al cambio de contenido de O_2 y CO_2 , al incrementar el nivel de CO_2 , suprimir la sacarosa del medio, la planta fotosintetiza y empieza un conjunto de procesos de apertura y cierre de estomas. La composición del sitio interno del frasco son las especies vegetales, medio nutritivo, etapa de desarrollo, condiciones ambientales, tipo de frasco, presencia de gases como O_2 , CO_2 , N_2 y volátiles tales son el vapor de agua, etanol, acetaldehído y etileno (Sinmaleza y Grijalva, 2018, p.19). En los sistemas que emplean transferencia neumática del medio nutritivo ejecutan la ventilación

forzada la misma que renueva la atmosfera interna completamente, ocurriendo durante cada inmersión de ahí que es causado directamente por el compresor que contienen concentraciones de gases y humedad relativa que estimula la transpiración del material vegetal e indirectamente por el movimiento del líquido con un efecto positivo (Piedra, 2014, p.13).

B. Beneficios de los Sistemas de Inmersión Temporal

Estos sistemas no son considerados como una alternativa o reemplazo de la micropropagación sino, más bien se los considera como una herramienta complementaria que presenta una serie de puntos a favor para el cultivo *in vitro*, entre los cuales tenemos:

- La inmersión temporal permite que los explantes estén en contacto con el medio líquido de forma intermitente y por cortos periodos de tiempo, permitiendo así el contacto con toda la superficie vegetal.
- No existe limitaciones con respecto al intercambio gaseoso y se logra controlar la composición del medio y la atmosfera de los biorreactores.
- La implementación de estos sistemas disminuye los costos de producción y mejora considerablemente el coeficiente de multiplicación.
- Aumenta el porcentaje de enraizamiento y la supervivencia de las plantas en la etapa de aclimatación.
- Las condiciones óptimas del medio de cultivo, los factores ambientales, la frecuencia y tiempo de inmersión, permiten vencer las limitaciones presentadas en los procesos convencionales (Zúñiga et al., 2009, pp.23-29).

1.2.4. *Vaccinium corymbosum* (Arándano azul)

Endémica de Norte América y cultivada también en otros continentes como Australia África, Europa, Asia, parte de Sudamérica y Nueva Zelanda, perteneciente a la familia Ericáceas y género *Vaccinium*. Los arándanos azules son cotizados por contener gran cantidad de compuestos fenólicos antioxidantes que son beneficiosas para la salud, ayuda a que los tejidos no envejezcan y a la memoria, evita el deterioro visual, disminuyen el riesgo de padecer cáncer, fortalece las defensas, coadyuvante en diabetes y en infecciones de vías urinarias (El Herald, 2020, párr.5), son conocidos también como reductores del colesterol, presentan propiedades antibióticas, antiinflamatorias y antitrombóticas (prevención de enfermedades cardiacas, y anticoagulantes de la sangre) (Nikolaeva-Glomb et al., 2014, pp. 51–54); optimizan la salud de muchas maneras y presentan vitaminas como la C, K, manganeso, minerales, fibras dietéticas, triterpenoides y que son realmente beneficiosas para llevar una alimentación saludable (León, 2018, párr.1-2).



Figura 8-1: Arándano azul (*Vaccinium corymbosum*)

Fuente: (León, 2018, párr.1-2).

Requiere menos de 400 horas de frío, presenta fruta grande, de color azul claro, redondo que se produce en racimos, buen sabor y presen altos rangos de grados Brix, planta vigorosa arbustiva, de hábito abierto con altura estimada de 25 a 30 cm y requiere poco manteniendo, florecimiento prematuro lo cual presenta desventaja por la presencia de heladas. Planta robusta y productiva. Se selecciona plantas madre que cumplan con características de calidad de modo que se obtengan clones con un buen genotipo (Baldomero et al., 2017, pp.138-155).

1.2.5. Arándano en el Ecuador

La calidad del fruto se ve reflejada por las condiciones climáticas de la línea equinoccial como la luminosidad que influye directamente en los grados brix y el tamaño del fruto, una altitud de hasta 2800 metros, condiciones del medio ambiente y un clima similar durante todo el año, lo que permite obtener cosechas en todos los meses (lo cual no sucede en otros países como Estados Unidos y Chile debido a sus estaciones climáticas), siendo la Sierra y Costa las principales regiones donde se presentan climas apropiados ya que cuentan con altas temperaturas por el día y bajas durante la noche, además la tierra del país se caracteriza por ser muy rica en nutrientes, lo cual no se encuentran en otros países como Perú por ejemplo que cuenta con tierras secas. A su vez técnicos internacionales coinciden que el arándano del Ecuador es más delicioso (Cárdenas, 2019, párr.1-3).

Una planta de arándano se puede cosechar por 10 a 15 años, donde su producción varia inicialmente, ya que durante el primer año de cosecha se obtiene un kilo del fruto por planta, y va escalando hasta el cuarto año de producción donde se obtiene alrededor de 3,5 kg de frutos, cosechándose cada seis a siete meses (González, 2018, párr.18).

En el Ecuador existen empresas que presentan producción de tres toneladas y su producto se vende en el mercado local, sin embargo, tienen miras a la exportación a Países Árabes su cultura aprecia las frutas tropicales y presentan una demanda alta, Asia y Europa (Villa, 2013, p.27).

1.2.6. Mercado Internacional

Estados Unidos de América es el mayor productor de arándano en el mundo y también el primordial consumidor.

Esta fruta es consumida regularmente en los Estados Unidos para la producción de varios alimentos fabricados como dulces, jugos, jaleas y mermeladas, para satisfacer su demanda per cápita de 3,6 kg/persona al año deben a importarlo por varios períodos (Das et al., 2017, pp.650–662). El arándano es un arbusto perenne, su fruto posee color oscuro, azulada o rojiza, es de forma esférica que puede variar de 1 a 2 cm de diámetro, presenta un valor nutricional alto en vitamina C y en fibras, libre de grasas y bajo en sodio según la *Food and Drug Administration (FDA)* de los Estados Unidos a su vez que es uno de los productos con gran cantidad de antioxidantes siendo así un cultivo con demanda exponencial a nivel mundial (Clegg et al., 2011, pp.335–338).

1.2.7. Multiplicación del Arándano

Se obtiene por semillas, hijuelos, estaquillado y micropropagación. La técnica de multiplicación por semilla es la que se emplea en la investigación de variedades nuevas. El estaquillado presenta un éxito limitado ya que el enraizamiento es de bajo rendimiento. La técnica de mayor éxito y la más utilizada es la micropropagación *in vitro* convencional, según la especie y la variedad presentando varias ventajas ya que ayuda a las plantas a que tengan una mayor tendencia a la brotación lateral, lo que incrementa potencialmente su productividad y el material vegetal está libre de enfermedades no obstante el principal inconveniente es su coste elevado (Villa, 2013, p.27).

1.2.8. Vermicompostaje

Es un proceso de biooxidación, degradación y estabilización de la materia orgánica intervenida por la acción combinada de lombrices y microorganismos bajo condiciones aerobias y mesófilas, con el que se obtiene un producto final estabilizado denominado vermicompost. Este producto es un fertilizante orgánico bio-regular de color negrozco, homogéneo y con olor a mantillo del bosque que tiene la capacidad de actuar como corrector del suelo (Villegas y Canepa, 2017, pp.394).



Figura 9-1: Vermicompostaje

Fuente: (Delegación del Medio Ambiente y Servicios de la Ciudad, 2017, p.2).

La descomposición de la materia orgánica se lleva a cabo de forma: directa, las lombrices se alimentan de restos orgánicos y al desplazarse aumentan la porosidad, aireando el sustrato de manera automática. Indirecta las lombrices excretan hasta un 60% de lo que ingieren, estimulando la microflora del suelo, ya que el material digerido es un óptimo microhábitat para una gran variedad de microorganismos descomponedores del suelo (Delegación del Medio Ambiente y Servicios de la Ciudad, 2017, p.3).

1.2.8.1. Ventajas

- Menor empleo de mano de obra con respecto al compost tradicional, su producto se obtiene más rápidamente y con mayor calidad que el compost.
- Debido a la actividad de las lombrices, se mejora la estructura de los suelos, como la porosidad, la permeabilidad y aireación
- Incrementa la disponibilidad de elementos esenciales como el nitrógeno, fósforo o potasio, y, además, mejora la fertilización, sobre todo del nitrógeno.
- Mayor cantidad de nutrientes disponibles para los cultivos posee gran concentración de ácidos húmicos y ácidos fúlvicos (Villegas y Canepa, 2017, pp.394).

1.2.8.2. Desventajas

- Vigilar las condiciones de temperatura para que exista un correcto desarrollo de las lombrices.
- Al aplicar el abono al medio se deben separar las lombrices de este.
- Durante su proceso, requiere menor temperatura que el compost, por lo que puede producirse la germinación de semillas indeseables en los cultivos o jardines (Villegas y Canepa, 2017, pp.394).

1.2.9. Desarrollo Sostenible

Es un concepto que viene desarrollándose desde los años sesenta del siglo XX, en el cual se analizan los impactos generados al medio ambiente por las actividades antropogénicas, en especial su deterioro y el desgaste de los recursos naturales. Es por ello que La Organización de las Naciones Unidas (ONU) convoca en 1972 al *Congreso de Estocolmo* y es ahí donde nace el Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), organismo encargado de la temática ambiental alrededor del mundo teniendo en cuenta la relación industrial de desarrollo y sus efectos sobre el medio ambiente; por consiguiente en el informe *Our Common Future* (1987), se define al desarrollo sostenible como aquel encaminado a utilizar los recursos naturales para satisfacer nuestras necesidades pero sin comprometer el futuro y desarrollo de las generaciones futuras. En efecto todas las teorías de este modelo de desarrollo según (Foladori y Tommasino, 2005, p.42), se resumen en tres grandes ejes: la sustentabilidad es exclusivamente ecológica, sustentabilidad social limitada, coevolución sociedad-naturaleza Alaña Castillo et al. (2017, pp. 91–99). De lo anterior Garza (2007, pp.45-60), mantiene que el desarrollo sostenible se basa en una transformación económica y social, con la participación del estado y las empresas para generar políticas que permitan alcanzar una sustentabilidad integrada y fuerte.

1.2.10. Economía Circular

Como señalan Alaña Castillo et al. (2017, pp. 91–99), el medio ambiente albergó a la sociedad desde los tiempos remotos de la humanidad, la economía está dentro de la sociedad, la cual necesita de la interacción de la comunidad. En consecuencia, la economía existe dentro de la sociedad y antes dentro del medio ambiente (Alaña Castillo et al., 2017, pp. 91–99).

Es así como en 1976 el arquitecto y economista Walter Stahel expuso en su informe de investigación, escrito junto con Genevieve Reday, el enfoque de una economía en bucles (o Economía Circular) y su impacto en la generación de empleo, competitividad económica, ahorro de recursos y prevención de residuos. Por lo tanto, este concepto de aleja en grandes pasos al modelo clásico lineal de “tomar-hacer-disponer”; más bien es un modelo que corrige los problemas de la linealidad que pretende que los productos, componentes y recursos mantengan su utilidad y valor en todo momento, aplicando el reciclaje, reutilización, recirculación y reduciendo los residuos (Arroyo, 2018, pp.78–98).

En el Ecuador se ejecutan planes de participación en el conocimiento y aplicación de la Economía Circular, donde el reciclaje de residuos es el pilar fundamental en la toma de conciencia de hogares e instituciones que aplican el desarrollo sostenible.

1.3. Bases conceptuales

Explante

Término acuñado a los tejidos vegetales cultivados *in vitro*, es un tejido vivo, células sueltas, protoplastos, esporas o granos de polen, que es separado de su cuerpo original y posteriormente trasplantado a un medio artificial de cultivo para su crecimiento. Su selección es clave para el éxito de la micropropagación.

***In vitro* en plantas**

Significa cultivar material vegetal (plantas, brotes, explantes) en frascos de vidrio que representan un ambiente artificial que brindan condiciones de asepsia para un crecimiento libre de enfermedades, plagas o patógenos y además permite el control de los factores que afectan el desarrollo de las plantas.

Vitrificación

Es el proceso en el cual se generan mal formaciones en las plantas, causando dificultades en el funcionamiento de estas. Genera que las plantas sean incapaces de sobrevivir al estrés provocado después del traspaso al medio *ex vitro*.

Hiperhidratación

Es un desorden fisiológico que presentan los tejidos vegetales cultivados en condiciones *in vitro*, puede presentarse como resultado de diversas condiciones de estrés del proceso, este fenómeno genera que las hojas de los brotes sean gruesas, alargadas, arrugadas o encrespadas, con alta deficiencia de agua y de clorofila.

Totipotencia vegetal

La totipotencia es la potencia celular máxima, que le confiere a la célula la capacidad de dirigir el desarrollo total de un organismo. Es el término utilizado en biología para referirse a las células que poseen la capacidad de dar origen a varios tipos celulares, inclusive logrando una sola célula de estas dar origen a millones de embriones.

Biorreactor

Es un sistema que mantiene un ambiente biológicamente activo, es un recipiente en el cual hay unas condiciones controladas que permiten el desarrollo de una reacción mediante organismos vivos o sustancias bioquímicamente activas.

Sustentable

Se refiere al equilibrio de una especie con los recursos de su entorno. Se aplica a la explotación de un recurso natural por debajo de su límite de renovación, es decir sin comprometer el desarrollo de futuras especies.

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Localización del Estudio

El presente estudio de investigación se desarrolló en la provincia de Tungurahua, cantón Ambato, parroquia Ficoa, en las calles Av. De los Guaytambos 650 y La Delicia (Edificio Aventubike), donde se encuentran las instalaciones del Laboratorio de cultivo de tejidos vegetales LePlant.

2.2. Tipo de Investigación

Por el método de investigación mixta, según el objetivo aplicada, según el nivel de profundización en el objeto de estudio correlacional, según la manipulación de variables experimental, según el tipo de inferencia hipotética deductiva, según el periodo temporal transversal (Hernández et al., 2014, p.11; Patten y Newhart, 2017, pp.40-43).

2.3. Diseño de la Investigación

El diseño de la investigación es experimental.

2.4. Hipótesis

2.4.1. *Hipótesis Nula*

El Sistema de Inmersión Temporal en Biorreactores no es viable para incrementar la tasa de multiplicación de *Vaccinium corymbosum* a comparación del proceso de micropropagación convencional *in vitro*.

2.4.2. *Hipótesis de Trabajo*

El Sistema de Inmersión Temporal en Biorreactores es viable para incrementar la tasa de multiplicación de *Vaccinium corymbosum* a comparación del proceso de micropropagación convencional *in vitro*.

2.5. Identificaciones variables

2.5.1. SIT-Variables Dependientes

Tasa de Velocidad de Multiplicación

Coefficiente de Multiplicación

Largo de los explantes

Vigorosidad

2.5.2. SIT-Variables Independientes

Frecuencia de inmersión

Volumen de medio de cultivo

Tiempo de inmersión

2.5.3. SIT-Variables Interviniente

Composición del medio de cultivo

2.6. Población de estudio

Explantes obtenidos del proceso de micropropagación *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* (arándano azul).

2.7. Tamaño de la muestra

En base a los requerimientos de la empresa, criterio de la supervisora de la investigación y Gerente de Producción Ingeniera M.Sc. Paola Rivera juntamente con los investigadores se decidió utilizar un total de 20 explantes en cada tratamiento, con el fin de garantizar un proceso efectivo de multiplicación y evitar la pérdida de material vegetal.

2.8. Método de muestreo

El método de muestreo seleccionado para la investigación es de carácter no probabilístico puesto que la muestra se eligió basándose en la accesibilidad, criterio personal e intencional de los investigadores juntamente con la empresa, el “Muestreo dirigido o intencional”, se determinó

como el más adecuado para este fin debido a que los explantes usados para la investigación son los más adecuados por criterio.

2.9. Técnicas de recolección de datos

Mediante la siguiente tabla se evidenciará la recolección de datos de acuerdo con la viabilidad de las plantas presentes en cada Sistema de Inmersión Temporal.

Tabla 1-2: Matriz de recolección de datos

	Vigorosidad	No viables	Viables	Vitrificadas	Largo de brotes	Tasa de Velocidad de multiplicación	Coefficiente de multiplicación
SIT #1							
SIT #2							
SIT #1							
SIT #2							

Realizado por: Goyes, Janina y Rojas, Yanira, 2021.

2.9.1. Determinación de la Tasa de Velocidad de Multiplicación

$$TVM = \frac{N^{\circ} \text{ explantes finales} - N^{\circ} \text{ explantes introducidos}}{\text{tiempo}}$$

Fuente: (Schuler et al., 2005, pp.39-50)

2.9.2. Determinación del Coeficiente de Multiplicación

$$CM = \frac{N^{\circ} \text{ brotes totales}}{N^{\circ} \text{ brotes iniciales}}$$

Fuente: (Sigarroa-Rieche y García-Delgado, 2011, pp.347-354).

Los datos obtenidos se procesarán en el programa estadístico RStudio y se evaluarán mediante un análisis de varianza (Anova) y prueba de Tuckey si se requiere.

Con el diseño experimental empleado en el protocolo de *Vaccinium corymbosum* (arándano azul), se conseguirá identificar que variables son más ideales para la micropropagación *in vitro* como la variación de la frecuencia y tiempo de inmersión, para que la planta se multiplique y se obtenga una tasa de multiplicación alta.

Con referencia a la recolección de datos cualitativos, se evidenciarán mediante una observación directa de los hechos, estimando su vigorosidad.

2.9.3. *Determinación de parámetros de control y calidad del compostaje*

En lo que respecta al vermicompostaje, mientras se esté llevando a cabo el proceso de descomposición de los residuos vegetales, se realizarán controles de humedad periódicamente mediante la prueba del puño. Finalmente, una vez que el abono haya alcanzado la madurez, se analizarán parámetros como el pH, conductividad eléctrica relación C/N, materia orgánica, fósforo, potasio, calcio y magnesio con el fin de evaluar su calidad.

2.10. *Propagación in vitro de Vaccinium corymbosum*

El material vegetal fue receptado en el laboratorio el mismo día que se cortó en campo

2.10.1. *Desinfección*

De cada rama de arándano se retiraron las hojas sin dañar el meristemo, seguidamente se sumergieron en agua jabonosa y se cepillaron cuidadosamente, para cortar en segmentos de 2 cm aproximadamente, verificando que el meristemo se encuentre en este fragmento. Los explantes se colocaron en frascos de vidrio con agua-jabón y se llevaron a agitación por 20 min, una vez terminado se enjuagaron 3 veces con agua corriente, continuamente se vertió una solución de cloro al 20 %, se agitó por 15 min, se llevaron los frascos a la cámara de flujo laminar y se enjuagaron con agua estéril 3 veces, dejar en agua.



Figura 1-2: Proceso de Desinfección

Realizado por: Goyes Janina y Rojas Yanira, 2021.

2.10.2. Introducción

En cámara de flujo laminar los explantes se colocaron en servilletas y se secaron los meristemas uno por uno, seguidamente se cortaron los extremos de los explantes que presentaban oxidación y se sembraron en el medio de cultivo con agar en tubos de ensayo, se sellaron con plástico film y se llevaron al cuarto de cultivo.



Figura 2-2: Introducción de *Vaccinium corymbosum*

Realizado por: Goyes Janina y Rojas Yanira, 2021.

2.11. Implementación del SIT en Biorreactores en la empresa LePlant

Para la construcción del sistema se analizaron diseños de varios autores utilizados para el mismo propósito y que en dichas investigaciones se recalca la importancia de perfeccionar las condiciones de propagación *in vitro* empleando biorreactores para cada especie vegetal, dicho de otro modo, se requiere optimizar el diseño del biorreactor y las relaciones “biorreactor-medio de cultivo-planta”.

La implementación es de forma sencilla puesto que involucra materiales conseguidos en el comercio nacional. Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente se experimentó diseños, los mismos que serán descritos a continuación.

2.11.1. Biorreactores en frascos gemelos de vidrio

Para los biorreactores se utilizaron frascos de vidrio con una capacidad de 4,7l, uno destinado para los explantes y el otro para el medio de cultivo. Las perforaciones realizadas en las tapas de

aluminio tuvieron un diámetro de 10 mm con el propósito de instalar los tubos de vidrio para el ingreso del aire al sistema y el transporte del medio de cultivo. Los tubos destinados para el intercambio líquido se colocaron hasta el fondo de los frascos unos 25 cm y unos 7 cm por encima de la tapa aproximadamente, la unión entre los dos biorreactores se realizó por medio de una manguera transparente grado alimenticio de 10 mm. Para la inyección del aire, se utilizó la misma manguera para enlazar los tubos de vidrio de los frascos a las electroválvulas que controlaran el proceso. Finalmente se colocó un filtro de jeringa en la salida del tubo de vidrio y posteriormente se instaló la manguera que se conecta al compresor el cual permitirá el incremento de la presión para el traspaso del líquido de un recipiente a otro aplicando el principio de Pascal como se muestra en la Figura 3-2. Este proceso se lo aplicó para las dos unidades.



Figura 3-2: Biorreactores en frascos gemelos de vidrio

Realizado por: Goyes Janina y Rojas Yanira, 2021.

El ajuste de las mangueras se lo hizo por medio de abrazaderas de plástico las mismas que fueron colocadas en todas las uniones y los posibles puntos de fuga. Como soporte para los explantes se empleó una malla plástica de 2 mm x 2mm la misma que se ubicó unos 3 cm por encima del fondo de los biorreactores como se indica en la Figura 4-2.



Figura 4-2: Unión de los biorreactores de frascos gemelos

Realizado por: Goyes Janina y Rojas Yanira, 2021.

2.11.2. Biorreactores en frascos cuadrados para laboratorios

Básicamente se empleó frascos cuadrados para laboratorios GL 80 con capacidad de 1000 ml, como biorreactores albergando a los explantes y el medio de cultivo líquido, en las tapas de los frascos se realizaron perforaciones de 10 mm de diámetro donde se introdujo la manguera de poliuretano grado alimenticio también de 10 mm, para la unión de las mangueras con las tapas se utilizó acoples de $\frac{1}{4}$ con uniones rápidas y neplós hexagonales de $\frac{1}{4}$ con el fin de evitar fugas. Una de las mangueras se introdujo hasta el fondo del recipiente aproximadamente 17 cm, se colocó el acople, seguido de los neplós, en la parte inferior de la tapa, mientras que la otra manguera se introdujo unos 7 cm y la unión se efectuó de la misma manera que el caso anterior. En la parte superior de la tapa se colocó nuevamente el acople de unión rápida y se instaló otro tramo de la manguera. Este proceso se lo aplicó para los dos sistemas, como se muestra en la Figura 5-2.



Figura 5-2: Biorreactores del Sistema de Inmersión Temporal

Realizado por: Goyes Janina y Rojas Yanira, 2021.

Las mangueras que no llegan al fondo de los frascos son aquellas por las cuales se inyecta el aire que proviene del compresor, aplicando el principio de Pascal que en resumen nos indica que toda presión aplicada sobre un fluido se irradiará sobre toda la sustancia de manera uniforme (Hernández, 2017, p.23), lo que permite que el medio de cultivo líquido que se encuentra en un recipiente pase hacia el otro recipiente que contiene los explantes para su respectiva nutrición en un cierto periodo y tiempo de inmersión. El paso del aire desde el compresor a una presión en un intervalo de 0.15 a 0.16 MPa hacia los biorreactores se realiza por mangueras de poliuretano de 10 mm, las cuales están conectadas a las electroválvulas por medio de acoples, uniones rápidas y una Tee rápida, tal como muestra la Figura 6-2.



Figura 6-2: Biorreactores del SIT conectados a las electroválvulas

Realizado por: Goyes Janina y Rojas Yanira, 2021.

2.11.3. Programación y Automatización del SIT

LePlant adquirió un PLC (modulo lógico programable) LOGO 8 230RC marca SIEMENS que se emplea para automatizar pequeñas aplicaciones industriales ya que cuenta con grandes características con relación a hardware y software, posee un lenguaje cien por ciento gráfico y módulos de expansión que permiten ampliar sus conexiones (Fernández, 2017, pp.25-27); el mismo fue instalado por un Ing. Eléctrico empleando el programa logosoft 8. Esencialmente los controladores de tiempo (timers) son los encargados de activar y desactivar las electroválvulas solenoides que controlan la realización de un ciclo de inmersión completo. Uno de los timers es programado para abrir una de las válvulas permitiendo que el aire ingrese a uno de los recipientes y tras alcanzar el tiempo de inmersión determinado, la válvula se cierre, facilitando el traslado del medio de cultivo de un frasco a otro, relocalizándose al día las veces que se lo requiera. La programación se muestra en las Figuras 7-2 y 8-2.



Figura 7-2: Programación SIT 1
 TH tiempo de inmersión
 TL frecuencia de inmersión

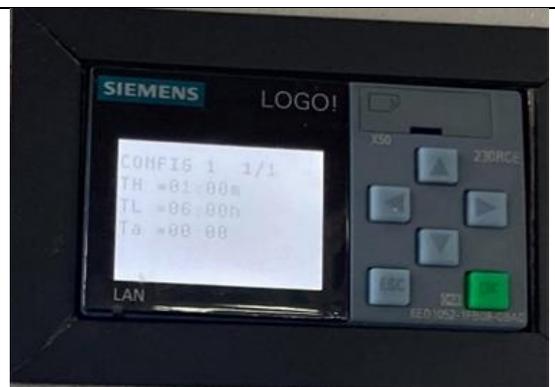


Figura 8-2: Programación SIT 2
 TH tiempo de inmersión
 TL frecuencia de inmersión

Realizado por: Goyes Janina y Rojas Yanira, 2021.

La programación para el Sistema de Inmersión Temporal en Biorreactores dentro de la empresa LePlant se especifica a detalle en la Tabla 2-2.

Tabla 2-2: Matriz de programación del Proceso

	SIT 1	SIT 2
Tiempo de Inmersión	1 min	3 min
Frecuencia de Inmersión	4 h	6 h
Total, de Inmersiones al día	6 inmersiones	4 inmersiones

Realizado por: Goyes, Janina y Rojas, Yanira, 2021.

2.12. Desinfección y Esterilización del SIT en Biorreactores

Inicialmente se realizaron los lavados de los biorreactores con una solución 5% de cloro (2000 ml de H₂O y 100 ml de Cl comercial) ya que es capaz de dañar los componentes celulares de los microorganismos, posteriormente se inyectó esta solución por las mangueras con la ayuda de una jeringuilla de 10 ml, cada lavado se efectuó por tres ocasiones con el objetivo de realizar la desinfección de forma óptima. En segunda instancia se enjuagó los frascos y las mangueras con agua, de igual forma con tres repeticiones para quitar los residuos de cloro como se indica en las figuras.



Figura 9-2: Desinfección SIT 1

Realizado por: Goyes, Janina y Rojas, Yanira, 2021.



Figura 10-2: Desinfección SIT 2

La esterilización consistió únicamente en que una vez desinfectados los recipientes se colocó el medio de cultivo dentro de ellos, se selló las tapas y se empaquetó utilizando papel Kraft. Por último, se autoclavó con las siguientes condiciones: temperatura de 121 °C y presión de 15 PSI.

2.13. Pruebas de contaminación

Una vez llevada a cabo la desinfección-esterilización y con el objetivo de evitar cualquier tipo de proliferación de microorganismos perjudiciales para el cultivo *in vitro* se realizaron pruebas por tres ocasiones y el tiempo estimado de prueba fue de 5 días. La primera prueba, se preparó un medio de prueba de 300 ml que contenía sacarosa (azúcar de mesa), Medio basal Murashige & Skoog (MS), y agua destilada, se vertió el líquido en los biorreactores gemelos de vidrio y se procedió a armar el sistema conectando las mangueras transparentes de grado alimenticio a las electroválvulas y se encendió el sistema. En los mismos frascos se realizaron dos pruebas de contaminación con el medio de cultivo definitivo para *Vaccinium corymbosum*, por un periodo igual de tiempo. La figura presentada a continuación muestra el proceso descrito anteriormente.



Figura 11-2: Pruebas de contaminación en los biorreactores gemelos

Realizado por: Goyes Janina y Rojas Yanira, 2021.

Por otro lado, en los frascos cuadrados para laboratorio se efectuaron tres pruebas, una con el medio de cultivo ensayo y dos con el medio de cultivo definitivo; el procedimiento a seguir fue el mismo que se aplicó para los biorreactores gemelos como se muestra en la Figura 12-2.



Figura 12-2: Pruebas de contaminación en los biorreactores cuadrados GL 80

Realizado por: Goyes Janina y Rojas Yanira, 2021.

2.14. Selección del material vegetal

Los explantes que se utilizaron para la presente investigación en la técnica de inmersión temporal en biorreactores, se seleccionaron del material vegetal *in vitro* convencional de la empresa LePlant, “*Vaccinium corymbosum* fase de multiplicación”. Se aisló la muestra necesaria en la cámara de flujo laminar, siguiendo el protocolo establecido como publica en la siguiente figura.



Figura 13-2: Selección de explantes

Realizado por: Goyes Janina y Rojas Yanira, 2021.

2.15. Preparación del medio de cultivo definitivo

Como se sugiere en el marco teórico, se procedió a preparar el medio de cultivo idóneo para este proceso, siguiendo los protocolos establecidos ya en la empresa. Esencialmente el medio contiene: Woody Plant Medium (WPM) + vitaminas + ácido ascórbico (2 mg/l) + sulfato de adenina (80mg/l) + sacarosa (20 gr/l) + Dimetilaminopurina 2ip (2 mg/l); para el pesaje se utilizó una balanza analítica perfectamente calibrada y tarada, seguidamente con la ayuda del agitador magnético se mezcló todos los componentes con agua destilada y se aforó al volumen requerido, finalmente se ajustó el pH a 5,50 (utilizando ácido sulfúrico e hidróxido de sodio como reguladores). Una vez ajustado el pH se vertió el medio de cultivo en los biorreactores y se esterilizó en el autoclave a una temperatura de 121 °C y presión de 15 PSI.



Figura 14-2: Preparación del medio de cultivo

Realizado por: Goyes Janina y Rojas Yanira, 2021.

2.16. Siembra de los explantes en los Biorreactores

Una vez realizadas las pruebas de contaminación se procedió a llevar los sistemas al cuarto de siembra, específicamente a las cámaras de flujo laminar, las cuales previamente se expusieron a 20 min de luz UV, una vez transcurrido este tiempo en cada biorreactor con la base (malla plástica), se colocaron 20 unidades biológicas, en condiciones asépticas con la ayuda de instrumentos como pinzas, bisturís y placas Petri previamente autoclavados y flameados, por último se cerraron los biorreactores y se los llevó al cuarto de crecimiento para ajustarlo a las válvulas solenoides.



Figura 15-2: Siembra de los explantes en los biorreactores

Realizado por: Goyes Janina y Rojas Yanira, 2021.

2.17. Puesta en marcha del proceso

Una vez que los explantes fueron sembrados en los biorreactores y estos se conectaron al sistema de válvulas, se procedió a encender el módulo lógico que controlará los tiempos y frecuencias de inmersión en los dos sistemas de inmersión temporal.

2.18. Elaboración del Vermicompostaje

2.18.1. Construcción de las cajas de compostaje

Estas cajas se las construyeron con madera en dimensiones de 40x60 cm, con el fin de que sean sutiles y adecuadas para el proceso; como base se colocó una malla plástica de 9mm la misma que se sujetó con grapas.

2.18.2. Recolección del material

El material para las camas de las lombrices fue totalmente reciclado ya que se utilizó papel periódico, bolsas de té obtenidas de residuos domésticos, aserrín de un aserradero conocido y hojas secas recolectadas de parques aledaños a la empresa.

En cuanto a las lombrices, estas se obtuvieron de forma libre del “Centro de Investigación e Innovación Tecnológica Agropecuaria de Tungurahua” ubicada en el cantón Píllaro, las cuales ya se encontraban realizando el proceso de vermicultura. Finalmente, los residuos de la empresa se recolectaron en recipientes de plástico los mismos que contenían agar, restos minúsculos de plantas y en esencia el material vegetal desechado del proceso. La Figura 16-2 muestra que los residuos fueron picados a un tamaño adecuado para facilitar el proceso de degradación.



Figura 16-2: Picado de residuos vegetales

Realizado por: Goyes Janina y Rojas Yanira, 2021.

2.18.3. Montaje de las cajas de compostaje

En primer lugar, se situó la caja sobre las bases de ladrillos y se procedió a poner la primera capa de tres hojas de papel periódico humedecido, seguido de esto se colocó una mezcla de papel periódico rasgado, aserrín y las bolsas de té abiertas, se utilizó estos materiales de préstamo ya que no generan fermentación y ayudan a tener una mezcla más esponjosa y posee mejor oxigenación. La Figura 17-2 muestra el proceso.



Figura 17-2: Preparación de la cama para las lombrices

Realizado por: Goyes Janina y Rojas Yanira, 2021.

Con el fin de que las lombrices se adapten a su nuevo ecosistema se las dejó únicamente en la cama preparada por un periodo de cinco días. Transcurrido este tiempo se procedió a realizar el proceso de alimentación, el cual consistió en colocar todos los residuos vegetales colectados.



Figura 18-2: Incorporación de los residuos vegetales al proceso

Realizado por: Goyes Janina y Rojas Yanira, 2021.

Por último, se colocó una bandeja plástica de aproximadamente las mismas dimensiones de las cajas de madera para la recolección de los lixiviados generados en el proceso de vermicompostaje.



Figura 19-2: Bandeja de recolección de lixiviados

Realizado por: Goyes Janina y Rojas Yanira, 2021.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Introducción de *Vaccinium corymbosum*

De las estacas con su respectivo meristemo, se obtuvieron brotes laterales, los cuales se utilizaron para la fase de multiplicación empleando la técnica de Inmersión Temporal en Biorreactores. La siguiente figura muestra el proceso.

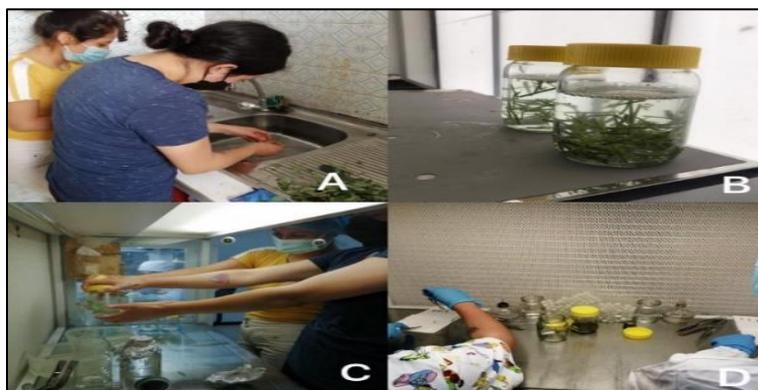


Figura 1-3: Proceso de Introducción de *Vaccinium corymbosum*
A. Lavados del material vegetal. B. Desinfección de las estacas en el agitador. C. Enjuagues del material en la cámara de flujo laminar. D. Introducción del material vegetal en el medio de cultivo.

Realizado por: Goyes Janina y Rojas Yanira, 2021.

3.2. Implementación del SIT en Biorreactores en la empresa LePlant

Una vez concluidas las pruebas en los Biorreactores en frascos gemelos de vidrio y en los Biorreactores en frascos cuadrados para laboratorio GL 80, se determinó que el más adecuado para el proceso es el segundo sistema puesto que presentó una serie de ventajas en contraste con el primero.

- Biorreactores en frascos gemelos de vidrio: una vez puesta en marcha la inyección de aire se produjo fugas en el sistema debido a la elevada presión que se requería para el traslado del medio de cultivo de un frasco a, ocasionando que las mangueras explotaran. Por otra parte, se evidenció problemas de contaminación ocasionados por las tapas de aluminio ya que estas al entrar en contacto con el aire generaron óxido, el cual afectó el medio de cultivo haciendo que se torne turbio; el utilizar filtros de jeringa generó taponamiento en el sistema impidiendo la

circulación del aire. Todos estos parámetros provocaron la ineficiencia de este sistema descartándolo para las pruebas con las unidades biológicas, como se muestra en la Figura 1-3.

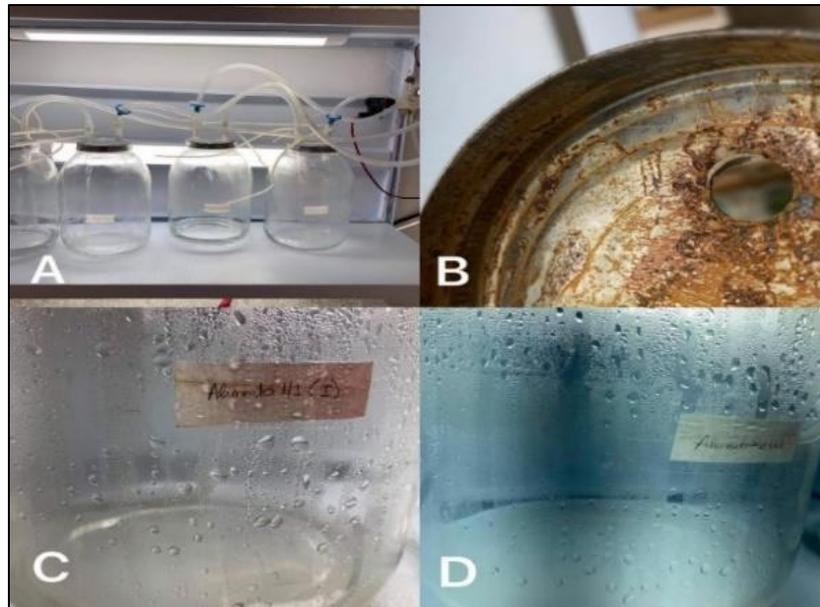


Figura 2-3: Implementación del SIT en los frascos gemelos de vidrio

A. Vista general del sistema en frascos gemelos de vidrio conectado. **B.** Generación de óxido en las tapas de aluminio. **C.** y **D.** Contaminación de los medios de cultivo (Alimento I y Alimento II).

Realizado por: Goyes Janina y Rojas Yanira, 2021.

- Biorreactores en frascos cuadrados para laboratorio GL 80: como se mencionó anteriormente este sistema fue superior ya que, en primer lugar, al ser de vidrio de borosilicato resisten temperaturas de hasta 140°C favorable para el proceso de autoclavado, las tapas de polipropileno fueron ideales para evitar la contaminación y la generación de óxido, garantizando el cierre hermético. Según lo mencionado por Camposano y Ibarra (2019, p.9) el tamaño ideal oscila entre 1 a 20 litros, encontrándose dentro de este rango, al emplear los frascos de 1000 ml, la manipulación de los mismos fue más práctica y a su vez la presión requerida para la transferencia del líquido fue mucho menor que en el primer sistema. El uso de acoples, uniones rápidas y neplos eliminó la posibilidad de que se produzcan fugas tanto de aire como de medio de cultivo y finalmente al utilizar la manguera de poliuretano grado alimenticio se brindó mayor resistencia a explosiones del sistema. Estos puntos a favor fueron los determinantes para elegir este como el ideal para los ensayos con los explantes.

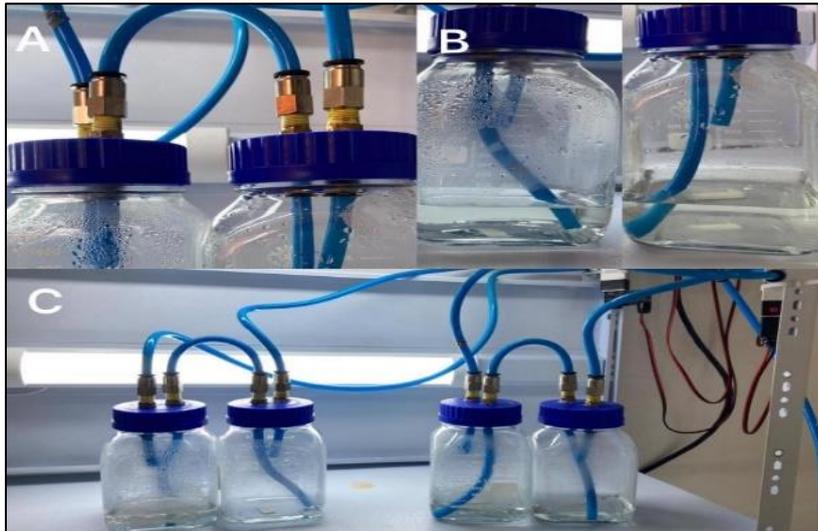


Figura 3-3: Implementación del SIT en los frascos cuadrados GL 80

A. Uniones rápidas, acoples y neoplos de ¼. **B.** Medios de cultivo sin presencia de contaminación (Alimento I y Alimento II). **C.** Vista general del sistema en frascos cuadrados para laboratorio GL 80 conectado.

Realizado por: Goyes, Janina y Rojas, Yanira, 2021.

3.3. Pruebas de contaminación

Tabla 1-3: Matriz de las pruebas de contaminación realizadas en los SIT de frascos gemelos de vidrio

SIT	N° de Prueba	Sin Contaminación	Contaminación
SIT #1	1		x
SIT #1	2		x
SIT #1	3		x
SIT #2	1	x	
SIT #2	2		x
SIT #2	3		x

Realizado por: Goyes, Janina y Rojas, Yanira, 2021.

Una vez transcurrido el período estimado de cinco días para la proliferación de cualquier tipo de contaminación por microorganismos, se determinó que el Sistema de Inmersión Temporal número uno presentó rastros de contaminación en las tres ocasiones, mientras que el Sistema de Inmersión Temporal número dos no presentó contaminación en el primer ensayo, sin embargo, en las dos últimas pruebas, se presentó este fenómeno. Como se denotó anteriormente esta contaminación se generó debido a varios factores como las fugas de aire y medio de cultivo, la explosión de mangueras por la elevada presión y el óxido generado por las tapas de aluminio. Hay que tener en cuenta que los dos primeros ensayos fueron realizados con el medio de cultivo prueba y el último se lo realizó con el medio de cultivo definitivo.

Tabla 2-3: Matriz de las pruebas de contaminación realizadas en los SIT de frascos cuadrados para laboratorio GL 80

SIT	N° de Prueba	Sin Contaminación	Contaminación
SIT #1	1	x	
SIT #1	2	x	
SIT #1	3	x	
SIT #2	1	x	
SIT #2	2	x	
SIT #2	3	x	

Realizado por: Goyes, Janina y Rojas, Yanira, 2021.

Se realizaron tres ensayos de contaminación, una con el medio de cultivo de prueba y dos con el medio de cultivo definitivo obteniendo resultados positivos, debido a las características de cierre hermético que facilitan el empleo de dichos frascos y la inexistencia de fugas, evitando la presencia de contaminación en los dos Sistemas de Inmersión Temporal y en sus repeticiones.

3.4. Fase de Experimentación

Previamente a la aplicación de los diferentes tratamientos se realizó un análisis de estadística descriptiva de los explantes a utilizar en los biorreactores para lo cual se consideró la longitud inicial de los mismos.

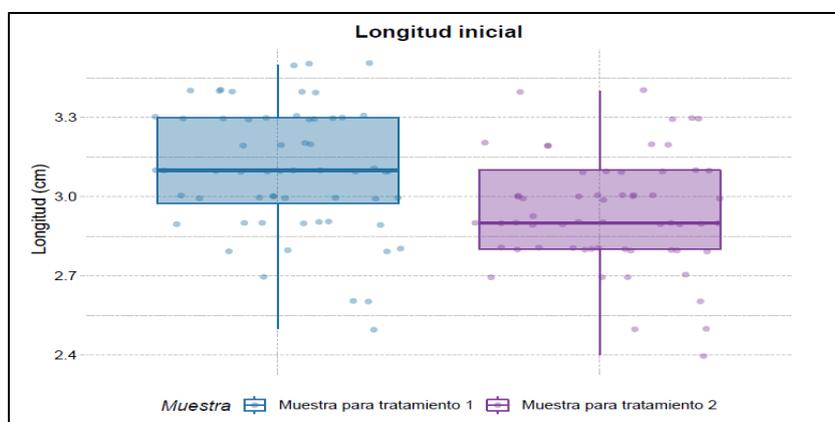


Gráfico 1-3: Gráfico de cajas de la Longitud inicial de los explantes

Realizado por: Goyes, Janina y Rojas, Yanira, 2021.

Tabla 3-3: Matriz de estadísticos

Estadístico	Muestra 1	Muestra 2
N°	60.0000	60.0000
Media	3.1017	2.9402
Desviación Estándar	0.2347	0.2107
Mediana	3.1000	2.9000
Mínimo	2.5000	2.4000
Máximo	3.5000	3.4000
Rango	1.0000	1.0000

Asimetría	-0.3523	-0.0152
Curtosis	-0.4189	0.0258

Realizado por: Goyes, Janina y Rojas, Yanira, 2021.

Es claro como se muestra en el gráfico que los promedios de la longitud inicial de las unidades biológicas a las que se les aplicará los distintos tratamientos son aproximadamente similares, al igual que las varianzas, garantizando de esta forma que la longitud de los explantes no afecte los resultados. Es importante destacar que toda esta información está recopilada aleatoriamente garantizando la independencia de cada variable.

De acuerdo a los datos expuestos en los Anexos B, C y D sobre los ensayos biológicos en el biorreactor uno (SIT #1), con características de 250 ml de medio de cultivo, tiempo de inmersión de 1 min y frecuencia de inmersión cada 4 horas se identificaron que los explantes al cabo de los 25 días presentaron una longitud media final de 7.1 cm para el primer ensayo, 6.8 cm correspondiente al segundo ensayo y finalmente 7.2 para el tercer intento, un total de plántulas viables de 68.02, 66,63 y 69,52 para el primer, segundo y tercer ensayo respectivamente, las cuales cuentan con 8 nudos cada una, formación de brotes laterales, mostrando signos de crecimiento en el ciclo establecido, no se visualizaron plántulas vitrificadas ni oxidadas, por lo tanto el total de plántulas son viables, dando una influencia positiva al coeficiente de multiplicación (CM) con valores de 3.4 para el primer ensayo, 3,33 para el segundo ensayo y 3,47 para el último ensayo y una tasa de velocidad de multiplicación (TVM) de 1.92 explantes/día perteneciente al primer intento, 1,865 explantes/día dato del segundo intento y finalmente 1,98 plantas/día del tercer intento.

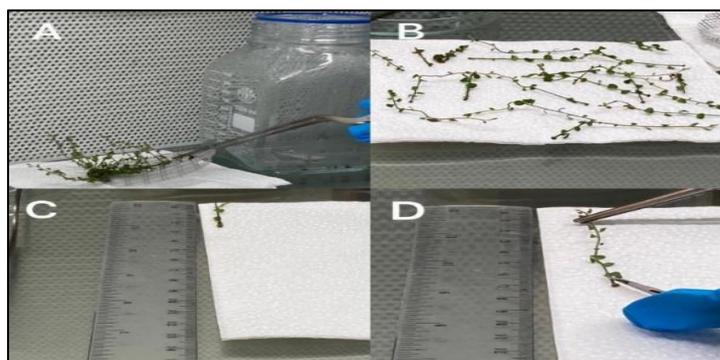


Figura 4-3: Resultados del Sistema de Inmersión Temporal 1

A. Extracción de las unidades biológicas en la cámara de flujo laminar **B.** Unidades biológicas con presencia de brotes **C.** Explantes antes de iniciar el ciclo en el SIT #1 **D.** Unidades biológicas una vez finalizado el ciclo de 25 días en el SIT #1.

Realizado por: Goyes, Janina y Rojas, Yanira, 2021.

En base a los datos enunciados en los Anexos E, F y G sobre la experimentación en el biorreactor con el tratamiento dos (SIT #2), para el cual se utilizó un volumen de 300 ml de medio de cultivo y un tiempo de inmersión de 3min con una frecuencia de 6 horas, se determinó que los explantes una vez terminado el ciclo de experimentación de 25 días presentaron una longitud media final para el primer ensayo de 6.3 cm, 6 cm para el segundo intento y 6.2 cm para el último, un total de plántulas presentes de 39.81 para el primer intento, para el segundo intento un dato de 38,93 y para el tercer intento un total de 40,19; en cuanto a la formación de nuevos brotes y brotes laterales fue un poco escasa. Por otro lado, no existió problemas de vitrificación ni oxidación en las unidades biológicas por lo que las mismas siguen siendo viables, pese a esto, en los ensayos se obtuvieron coeficientes de multiplicación (CM) de 1.9905,1.9465 y 2.0095 para el primer, segundo y tercer intento correspondiente y una tasa de velocidad de multiplicación (TVM) de 0.7924 explantes/día del primer ensayo, 0.7572 explantes/día referente al segundo y 0.8076 explantes/día del tercer intento, siendo significativamente menor en cuanto al tratamiento uno.



Figura 5-3: Resultados del Sistemas de Inmersión Temporal 2

A. Extracción de las unidades biológicas en la cámara de flujo laminar **B.** Unidades biológicas multiplicadas **C.** Explantes antes de iniciar el ciclo en el SIT #2 **D.** Unidades biológicas una vez finalizado el ciclo de 25 días en el SIT #2.

Realizado por: Goyes, Janina y Rojas, Yanira, 2021.

Según lo expuesto por Sánchez y Daquinta (2010, pp.1–5), se menciona que los tiempos de inmersión cortos provocan expansión en los tejidos y facilita un mayor contacto de estos con el medio de cultivo ya que la difusión de gases, renovándose así el ambiente gaseoso, a su vez las plántulas presentan una capa superficial de medio de cultivo en estado líquido, el mismo que no les permite deshidratarse, concordando con lo expuesto por Cárdenas (2015, p.110), en su investigación se reafirma que la frecuencia de inmersión es un parámetro relevante que se debe tomar en cuenta ya que determina la renovación sistemática de la atmosfera dentro del biorreactor, por otro lado

el estudio de McAlister et al. (2005, pp. 347-358) concuerda con lo expuesto en el presente trabajo, dando así que cada 4 horas se logró un mejor suministro de nutrientes, y una mejor atmósfera interna del recipiente, lo que contribuyó a conseguir explantes de mayor calidad e influenciaron de manera positiva en los datos obtenidos de la multiplicación de brotes a diferencia con la frecuencia de inmersión cada 6 horas correspondientes al SIT 2.

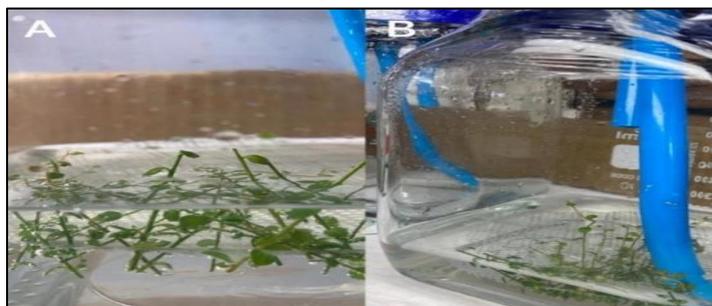


Figura 6-3: Unidades biológicas en el tiempo de inmersión
A. En contacto con el medio de cultivo. **B.** Proceso de inmersión temporal y difusión de gases.

Realizado por: Goyes, Janina y Rojas, Yanira, 2021.

3.5. Análisis Estadístico

Tabla 4-3: Matriz de resultados obtenidos en los tres ensayos en la fase de multiplicación de los Sistemas de Inmersión Temporal en un ciclo de 25 días

	Vigorosidad	No viables	Viables	Vitrificadas	Largo de brotes	Tasa de Velocidad de multiplicación	Coficiente de multiplicación
SIT #1	Buena	0	68.02	0	7.1	1.9208	3.401
SIT #2	Media	0	39.81	0	6.3	0.7924	1.9905
SIT #1	Buena	0	66.63	0	6.8	1.865	3.33125
SIT #2	Mala	0	38.93	0	6	0.7572	1.9465
SIT #1	Buena	0	69.52	0	7.2	1.9808	3.476
SIT #2	Media	0	40.19	0	6.2	0.8076	2.0095

Realizado por: Goyes, Janina y Rojas, Yanira, 2021.

En cuanto al análisis estadístico se aplicó un diseño completamente al azar a cada variable dependiente en estudio, los tratamientos son los mismos para cada variable.

- Variables respuesta: Número de explantes y Longitud Final
- Factor: Frecuencia-Volumen-Tiempo
- Tratamientos:
 - Tratamiento 1: Frecuencia: 1 minuto, volumen: 250 ml, tiempo: 4 horas
 - Tratamiento 2: Frecuencia 3 minutos, volumen: 300 ml, tiempo: 6 horas
- Unidades experimentales: 120

3.5.1. Modelo Estadístico

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} es la j-ésima planta medida en una variable con el i-ésimo tratamiento. μ Promedio global de la variable τ_i efecto del i-ésimo tratamiento ε_{ij} es el error atribuible a la medición Y_{ij} .

3.5.2. Comparación de las variables respuesta y los tratamientos

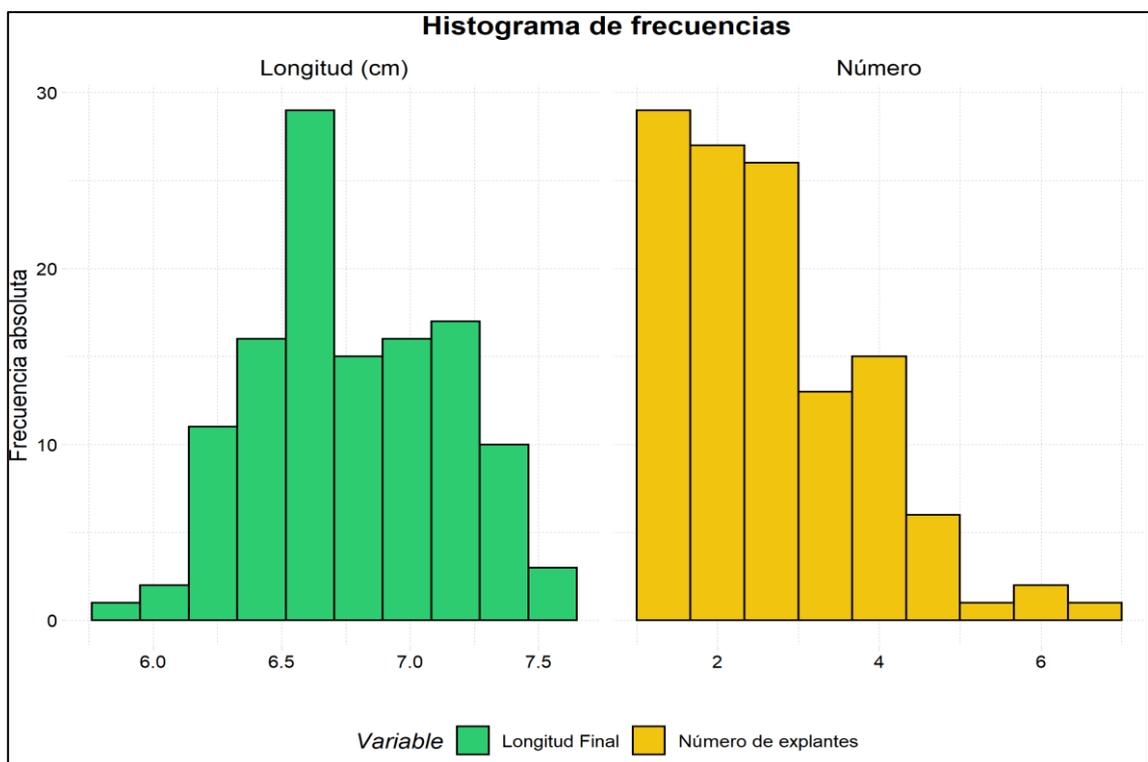


Gráfico 2-3: Histograma de Frecuencias de la comparación de variables respuestas y tratamientos

Realizado por: Goyes, Janina y Rojas, Yanira, 2021.

Tabla 5-3: Matriz de variables respuesta

Estadístico	Número de explantes	Longitud Final
Nº	120.0000	120.0000
Media	2.6850	6.7767
Desviación Estándar	1.2067	0.3502
Mediana	2.5000	6.8000
Mínimo	1.0000	5.9000
Máximo	7.0000	7.6000
Rango	6.0000	1.7000
Asimetría	0.9417	0.1314
Curtosis	0.8132	-0.5321

Realizado por: Goyes, Janina y Rojas, Yanira, 2021.

3.5.2.1. Variable respuesta Longitud Final

Se tiene un promedio de 6.78 cm del total de la muestra con una desviación estándar de 0.35 cm lo que nos indica poca variabilidad, la mediana es muy cercana a la media, un mínimo de 5.9 cm y un máximo de 7.6 cm, según el histograma de frecuencias existe mayor proporción de información entre 6.25 y 7.25, esta muestra parece ser simétrica.

3.5.2.2. Variable respuesta Número de explantes

Se tiene un promedio de 2.68 de número de explantes del total de la muestra con una desviación estándar de 1.21 lo que nos indica poca variabilidad, la mediana es muy cercana a la media, un mínimo de 1 y un máximo de 7, según el histograma de frecuencias existe mayor proporción de información entre 1 y 3, esta muestra tiene sesgo a la derecha.

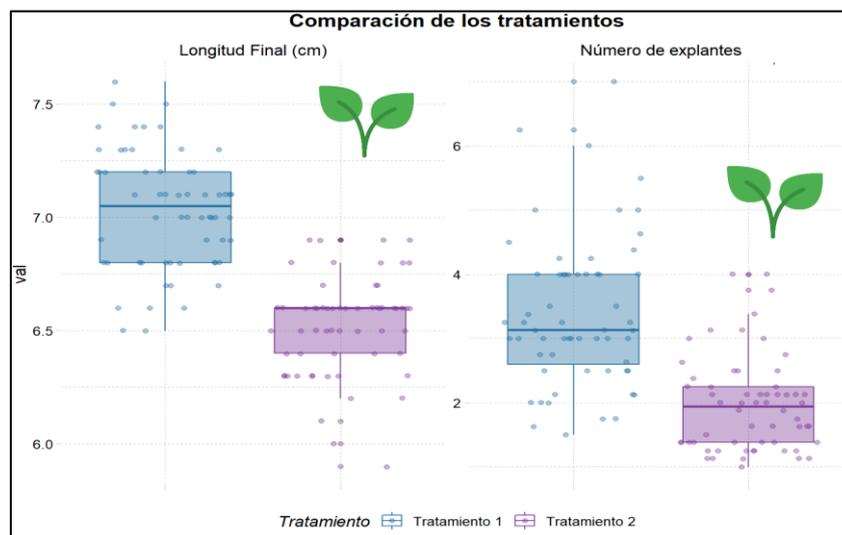


Gráfico 3-3: Gráfico de cajas de la Comparación de los tratamientos

Realizado por: Goyes, Janina y Rojas, Yanira, 2021.

Gráficamente es claro que el Tratamiento 1 está dando mejores resultados en las dos variables respuesta, existen unos pocos datos atípicos, pero no se encuentran muy lejanos por lo que se los asocia a los factores de ruido y se continúa con la investigación.

3.5.3. ANOVA para el Número de Explantes

Planteamiento de la hipótesis

$$\begin{cases} H_0: \mu_1 = \mu_2 \\ H_1: \mu_1 \neq \mu_2 \end{cases}$$

Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$

Tabla 6-3: Matriz ANOVA teórica

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F_0	Valor-p
Tratamientos	$SC_{Trat} = \sum_{i=1}^k \frac{Y_i^2}{n_i} - \frac{Y_{..}^2}{N}$	$k - 1$	$CM_{Trat} = \frac{SC_{Trat}}{k - 1}$	$\frac{CM_{Trat}}{CM_E}$	$P(F > F_0)$
Error	$SC_E = SC_T - SC_{Trat}$	$N - k$	$CM_E = \frac{SC_E}{N - k}$		
Total	$SC_T = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} Y_{ij}^2 - \frac{Y_{..}^2}{N}$	$N - 1$			

Realizado por: Goyes, Janina y Rojas, Yanira, 2021.

Tabla 7-3: Matriz de resultados para el ANOVA del Número de Explantes

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F_0	Valor-p
Tratamientos	61.827	1	61.827	65.459	5.954e-13
Error	111.453	118	0.945		
Total	173.28	119			

Realizado por: Goyes, Janina y Rojas, Yanira, 2021.

Con un p-valor menor al nivel de significancia Se rechaza la hipótesis nula y se concluye que con un nivel de confianza del 95% se tiene suficiente evidencia estadística para afirmar que los promedios de los tratamientos son diferentes.

3.5.4. ANOVA para la Longitud Final

Planteamiento de la hipótesis

$$\begin{cases} H_0: \mu_1 = \mu_2 \\ H_1: \mu_1 \neq \mu_2 \end{cases}$$

Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$

Tabla 8-3: Matriz de resultados para el ANOVA de la Longitud Final

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F_0	Valor-p
Tratamientos	7.8030	1	7.8030	135.57	2.2e-16
Error	6.7917	118	0.0576		
Total	14.5947	119			

Realizado por: Goyes, Janina y Rojas, Yanira, 2021.

Con un p-valor menor al nivel de significancia Se rechaza la hipótesis nula y se concluye que con un nivel de confianza del 95% se tiene suficiente evidencia estadística para afirmar que los promedios de los tratamientos son diferentes.

3.5.5. Comprobación de los Supuestos

- **Supuesto de Normalidad**

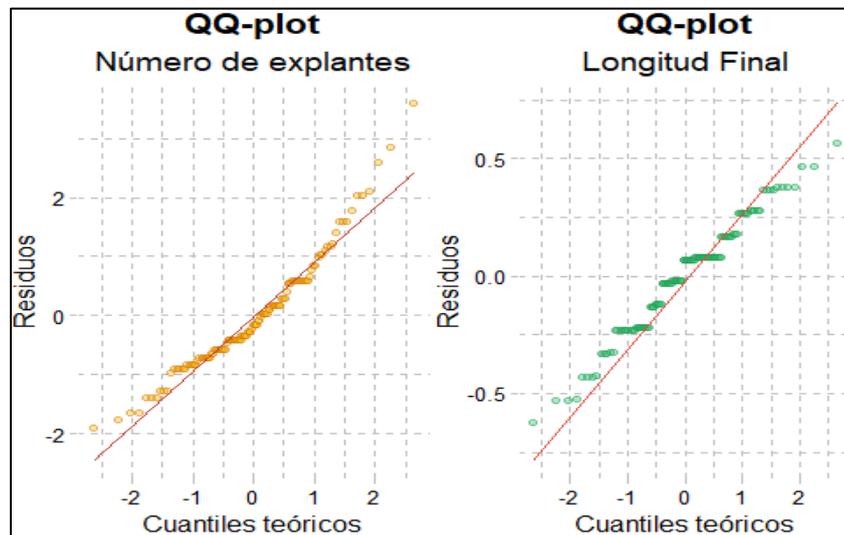


Gráfico 4-3: Gráfico de la comprobación del Supuesto de Normalidad

Realizado por: Goyes, Janina y Rojas, Yanira, 2021.

Los residuos se relacionan linealmente con los cuantiles teóricos de la distribución normal por lo que se cumple el supuesto, solamente en número de exámenes se pudo seguir observando los datos atípicos detectados anteriormente, pero se los considera puesto que pueden afectar a que los residuos sigan una distribución normal.

- **Supuesto de Homocedasticidad**

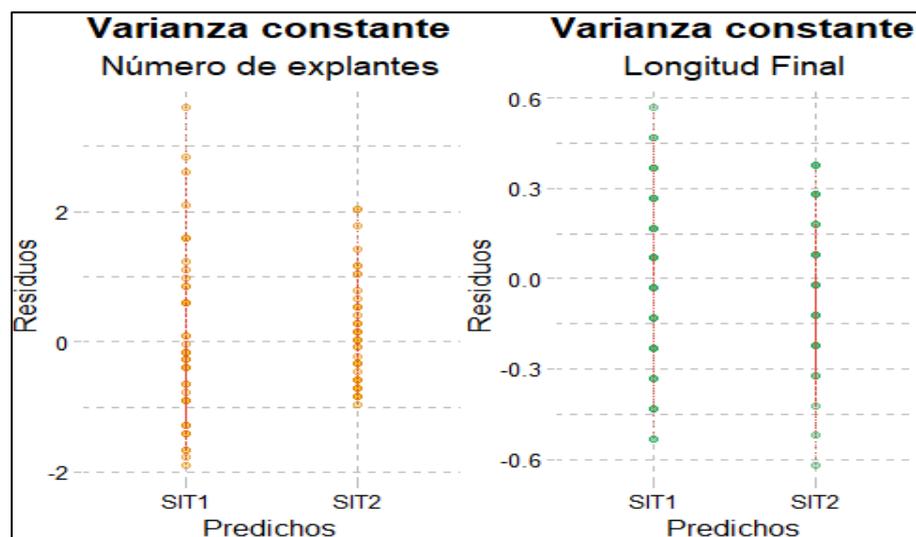


Gráfico 5-3: Gráfico de la comprobación del Supuesto de Homocedasticidad

Realizado por: Goyes, Janina y Rojas, Yanira, 2021.

Como se muestra en el gráfico, las dos variables no presentan una gran variabilidad, casi es la misma en ambas muestras, por lo tanto, se comprueba este supuesto, nuevamente en la variable número de explantes los datos atípicos afectan un poco la muestra, pero no fuera de los límites de tolerancia para esta investigación.

3.5.6. Variables Indicadoras

Tabla 9-3: Matriz de las Variables Indicadoras

Tratamiento	Largo de brotes	Tasa de multiplicación	Coefficiente de multiplicación
Tratamiento 1	7.1	1.9208	3.40100
Tratamiento 2	6.3	0.7924	1.99050
Tratamiento 1	6.8	1.8650	3.33125
Tratamiento 2	6.0	0.7572	1.94650
Tratamiento 1	7.2	1.9808	3.47600
Tratamiento 2	6.2	0.8076	2.00950

Realizado por: Goyes, Janina y Rojas, Yanira, 2021.

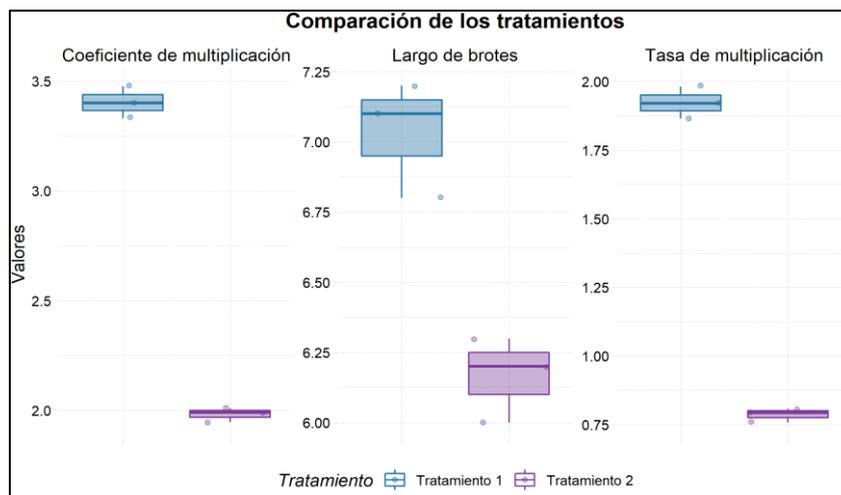


Gráfico 6-3: Gráfico de cajas de la comparación de los tratamientos

Realizado por: Goyes, Janina y Rojas, Yanira, 2021.

Los resultados de esta investigación dan evidencia suficiente para concluir que, en las variables indicadoras, el promedio del Tratamiento 1 es mucho más efectivo que el Tratamiento 2 en los tres indicadores. Se realizará un ANOVA para cada variable para corroborar esta hipótesis.

3.5.6.1. Largo de Brotes

Tabla 10-3: Matriz de resultados para el ANOVA de la Longitud de Brotes

Fuente de variabilidad	de	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F_0	Valor-p
Tratamientos		1.12667	1	1.12667	33.8	0.004357
Error		0.13333	4	0.03333		
Total		1.26	5			

Realizado por: Goyes, Janina y Rojas, Yanira, 2021.

3.5.6.2. Tasa de Multiplicación

Tabla 11-3: Matriz de resultados para el ANOVA de la Tasa de Multiplicación

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F_0	Valor-p
Tratamientos	1.93733	1	1.93733	963.31	6.421e-06
Error	0.00804	4	0.00201		
Total	1.94537	5			

Realizado por: Goyes, Janina y Rojas, Yanira, 2021.

3.5.6.3. Coeficiente de Multiplicación

Tabla 12-3: Matriz de resultados para el ANOVA del Coeficiente de Multiplicación

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	F_0	Valor-p
Tratamientos	3.02709	1	3.02709	963.31	6.421e-06
Error	0.01257	4	0.00314		
Total	3,03966	5			

Realizado por: Goyes, Janina y Rojas, Yanira, 2021.

Como se puede apreciar en cada caso se rechaza la hipótesis nula y se concluye que existe suficiente evidencia estadística para afirmar que el Tratamiento 1 es más efectivo que el Tratamiento 2.

3.5.6.4. Comprobación de Supuestos

- **Supuesto de Normalidad**

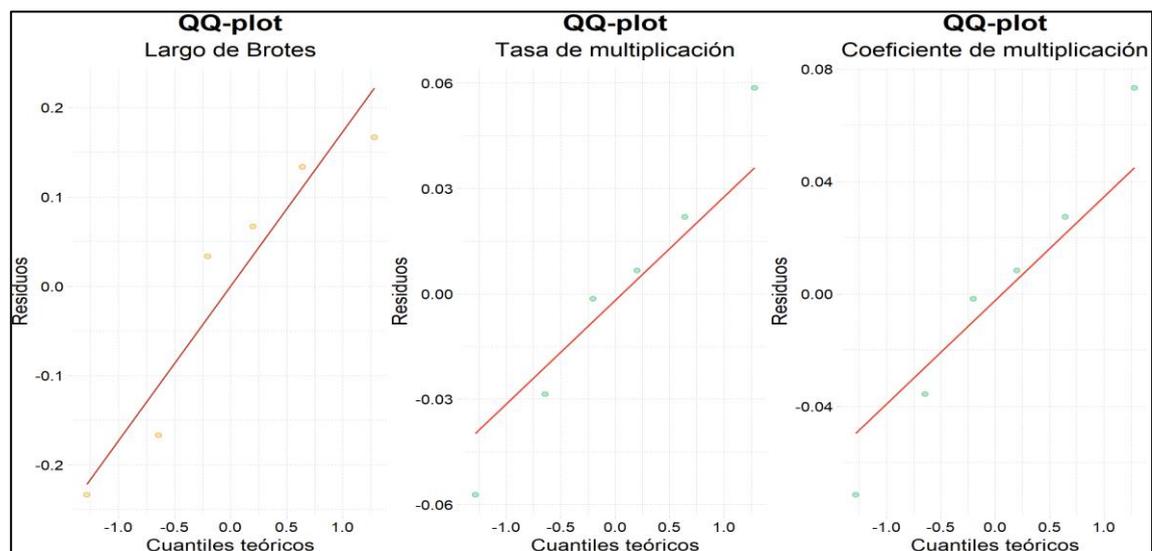


Gráfico 7-3: Gráfico de comprobación del Supuesto de Normalidad del ANOVA de las variables indicadoras

Realizado por: Goyes, Janina y Rojas, Yanira, 2021.

Los residuos se relacionan linealmente con los cuantiles teóricos de la distribución normal por lo que se cumpliría este supuesto de que los residuos sigan una distribución normal.

- **Supuesto de Homocedasticidad**

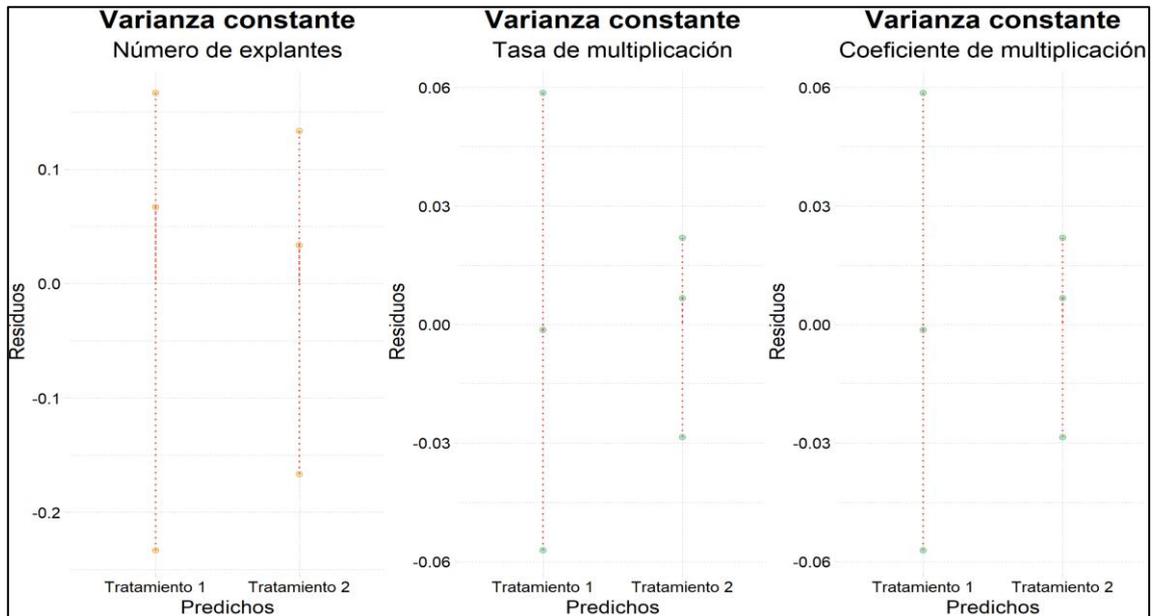


Gráfico 8-3: Gráfico de comprobación del Supuesto de Homocedasticidad del ANOVA de las variables indicadoras

Realizado por: Goyes, Janina y Rojas, Yanira, 2021.

Las variables no presentan gran variabilidad, lo que nos dice que poseen la misma en ambas muestras, por lo tanto, se comprueba este supuesto validando una vez más el modelo.

Una vez realizado el Análisis estadístico y comprobando los supuestos que validan el modelo de investigación se determinó finalmente que explantes cultivados en el primer biorreactor con cortos tiempos de inmersión, presentaron mayor número de brotes axilares por explante, en relación a las plántulas cultivadas en el biorreactor dos, el mismo que disponía de un tiempo de inmersión más largo, a su vez la longitud final de los brotes fue un parámetro muy notorio a la hora de estimar los resultados, debido a que se obtuvieron con mayor longitud los cultivos del Biorreactor número uno, por ende el tratamiento 1 con 250 ml, tiempo de inmersión 1 min y frecuencia de inmersión de 4 horas, se destacó favorablemente en relación al tratamiento 2 con 300 ml, tiempo de inmersión 3 min, frecuencia 6 horas, ya que condujo a una mayor tasa de multiplicación, siendo este resultado acorde a lo establecido por Georgieva et al. (2016, pp.46–51), quien manifiesta que el tiempo de inmersión más corto entre el contacto del medio con el explante proporciona mayor exposición de los explantes al aire, siendo este factor lo que incrementa la eficiencia de multiplicación de los tejidos. Concordando con Zúñiga et al. (2009, pp.23-29) el cual indica que los SIT son sistemas apropiados para la multiplicación *in vitro* de arándano, ya que no

induce a cambios en los patrones genéticos, a su vez el presente estudio coincide también con lo expuesto por Calisaya y Espinoza (2014, pp.21-22) donde se menciona que se trabaje con menores tiempos de inmersión puesto que son suficientes para la absorción de nutrientes por toda la superficie y no producen vitrificación ni oxidación en las plántulas, al contrario proporcionan una alta tasa de multiplicación, sin embargo cabe recalcar que la determinación del tiempo de inmersión puede variar para cada fase de micropropagación tal como indica (Gontier et al., 2013, p.329).

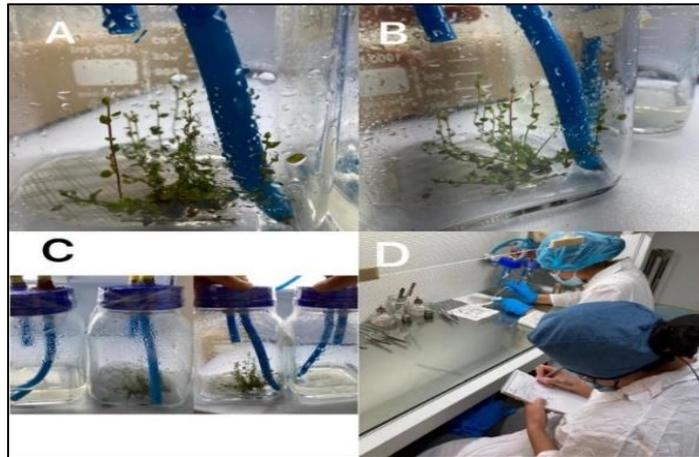


Figura 7-3: Unidades Biológicas en fase de Multiplicación

A. SIT #1 con las unidades biológicas en fase de multiplicación. **B.** SIT #2 con las unidades biológicas en fase de multiplicación. **C.** Sistemas de Inmersión temporal al final del ciclo. **D.** Evaluación de los explantes en la cámara de flujo laminar una vez terminado el ciclo de 25 días de prueba.

Realizado por: Goyes, Janina y Rojas, Yanira, 2021.

3.5.7. *Vigorosidad*

En cuanto a la vigorosidad y aspecto de los explantes, en lo que respecta al biorreactor con el Tratamiento 1 presentó unidades biológicas con gran número de hojas, coloración verde, tallos robustos, ausencia o poca presencia de callo, inexistencia de vitrificación, necróticos ni malformaciones, en contraste se presenciaron brotes sanos y bien formados. Por otra parte, los explantes sometidos al Tratamiento 2 presentaron una vigorosidad en general regular ya que no se generó vitrificación ni presencia de necróticos y la coloración se mantuvo verde sin embargo el número de hojas y el crecimiento de nuevos brotes fue sin duda menor que en el Sistema de Inmersión Temporal #1, a su vez la robustez de los tallos fue escasa.

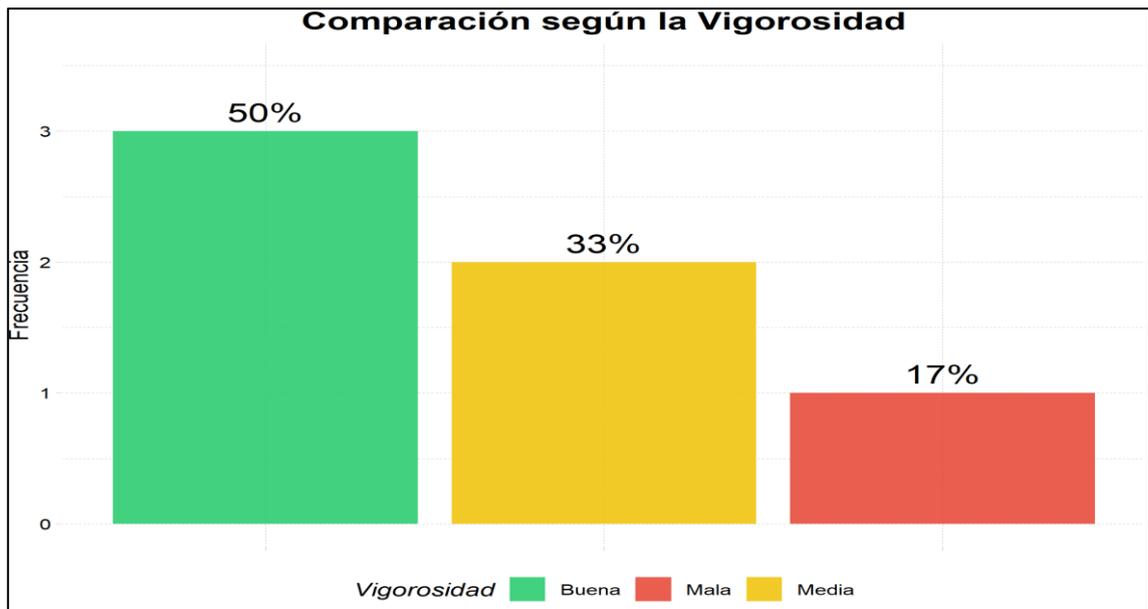


Gráfico 9-3: Gráfico de barras de la Vigorosidad de los explantes sometidos al Tratamiento 1 y al Tratamiento 2 respectivamente

Realizado por: Goyes, Janina y Rojas, Yanira, 2021.

En el gráfico de barras podemos observar que el 50% de las unidades biológicas puestas a prueba corresponden al Tratamiento 1 y el 33% de vigorosidad media y el 17% de vigorosidad mala hacen alusión a los explantes sometidos al Tratamiento 2.

3.5.8. Tasa de Multiplicación en Biorreactores versus el proceso convencional

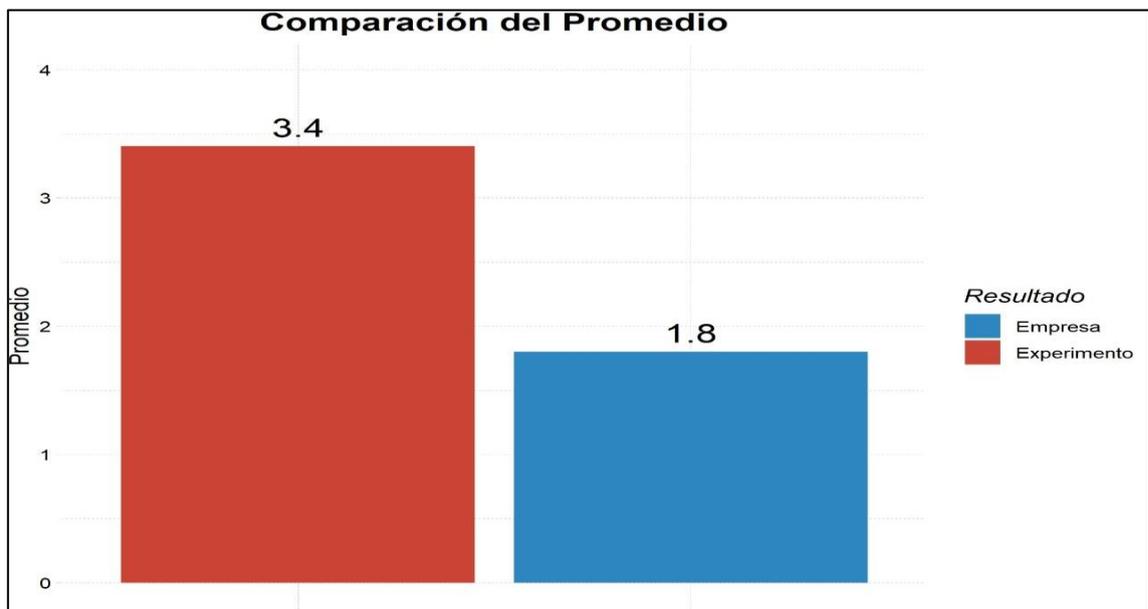


Gráfico 10-3: Gráfico de barras de la comparación de la Tasa de Multiplicación de los Sistemas de Inmersión Temporal y el proceso convencional

Realizado por: Goyes, Janina y Rojas, Yanira, 2021.

De acuerdo con el gráfico y por estadística descriptiva se afirma que la Tasa de multiplicación de *Vaccinium corymbosum* al implementar Sistemas de Inmersión Temporal es superior en aproximadamente el doble al valor promedio obtenido en la empresa para esta especie. El contraste de análisis estadístico por la prueba de T-student se lo realizó para verificar si el promedio del coeficiente de multiplicación experimental es mayor al promedio del coeficiente de multiplicación de la empresa.

- Planteamiento de la Hipótesis

$$\begin{cases} H_0 & \mu \leq 1.8 \\ H_1 & \mu > 1.8 \end{cases}$$

- Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$
- Estadístico de prueba:

$$t_0 = \frac{\bar{x} - \mu_0}{\frac{s}{\sqrt{n}}}$$

- Criterio de Rechazo

Si $t_0 > t_\alpha$ se rechaza la hipótesis nula.

Por medio del software R-studio se obtiene el valor de $t_0 > 2.919986$ por lo tanto existe suficiente evidencia para rechazar H_0 a favor de H_1 , determinando de esta forma que el promedio de la Tasa de multiplicación de la muestra del Biorreactor 1 es significativamente mayor al promedio de la Tasa de Multiplicación de la empresa. Con el propósito de validar esta conclusión y afirmar la teoría se comprobó el supuesto de normalidad con la prueba de Shapiro Wilk.

3.5.9. Vermicompostaje

Una vez finalizado el proceso de degradación de los residuos vegetales de la empresa LePlant y alcanzado el período de maduración de cinco meses del vermicompostaje, se procedió a la cosecha del mismo para posteriormente realizar los análisis respectivos con el fin de evaluar su calidad. Se procesó una muestra de 1 kg, la cual fue enviada a las instalaciones del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias - Estación Experimental Santa Catalina - Laboratorio de Análisis de Suelos Plantas y Aguas, en la Tabla 12-3 se muestran los parámetros analizados en dicha muestra y los valores obtenidos.

Tabla 13-3: Matriz de resultados de parámetros de calidad del abono orgánico

N (%)	P (%)	K (%)	Ca (%)	Mg (%)	S (%)	CE (ms/cm)	Materia Orgánica (%)	Carbono Orgánico (%)	pH	C/N
0.81	0.34	0.66	1.086	0.47	0.21	1.20	22.33	12.95	8.5	16.0474

Fuente: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, 2021, p.1.

Realizado por: Goyes, Janina y Rojas, Yanira, 2021.

En lo que respecta a los nutrientes principales o macronutrientes, como nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K), los porcentajes obtenidos son relativamente bajos en comparación a los obtenidos por Castillo et al. (2000, pp.74–79) y Delgado Arroyo et al. (2004, pp.83–86), esto se debe a que la presencia de estos nutrimentos está relacionada directamente con la naturaleza del material seleccionado, como en el caso del nitrógeno su disminución se debió a la desnitrificación microbiana generada por la humedad del agar, como sugiere Suthar (2007, pp.1231–1237), el incremento del N en el producto final se debe a la mineralización de los residuos por parte de los anélidos lo cual no ocurrió en este caso. En el caso del fósforo, al no emplear ningún tipo de estiércol se pierde una fuente fundamental de este elemento como asegura Delgado Arroyo et al. (2004, pp.83–86); en cuanto a los oligoelementos se obtiene un porcentaje considerable de calcio Ca, valores que concuerdan con los obtenidos en investigaciones por Suthar (2007, pp.1231–1237), con respecto a magnesio Mg y azufre S los valores son regulares pero bajos en comparación a los reportados por Durán y Henríquez (2007, pp.41–51). Según evaluaciones descritas por Castillo et al. (2000, pp.74–79) un pH óptimo para una enmienda orgánica oscila entre 6-8 siendo este ligeramente alcalino. Muchos autores como Suthar (2007, pp.1231–1237) acuerdan una óptima relación C/N inferior a 20 por lo que en esta experimentación se cumple este propósito. Finalmente el porcentaje de materia orgánica MO de 22.33% y el de carbono orgánico de 12.95% son considerados buenos ya que se asimilan a los obtenidos en las investigaciones de Durán y Henríquez (2007, pp.41–51) afirmando que ayudarán en la estructura y fertilidad del suelo al que sea agregado.

CONCLUSIONES

- Los Sistemas de Inmersión Temporal dependen directamente de la estabilización de una frecuencia y tiempo inmersión específicos para cada especie, en efecto al hablar de *Vaccinium corymbosum* (arándano azul), se determinó que a menor frecuencia y tiempo de inmersión (1 min/4 horas) las unidades biológicas presentaron un tasa de multiplicación de 3.402, la cual fue superior a la obtenida en el Tratamiento 2, (3 min/6 horas), por consiguiente los explantes presentaron buena vigorosidad, hojas de tonalidad verde, ausencia de vitrificación y un mayor número de brotes ya que a menor tiempo de contacto con el medio líquido, el ambiente gaseoso se renueva y por ende provoca expansión en los tejidos, concluyendo que el Tratamiento 1 generó un efecto positivo en la fase de multiplicación.
- Ciertamente los Sistemas de Inmersión Temporal en Biorreactores se registran como una técnica eficiente en cuánto al proceso multiplicación *in vitro*, para lo cual mediante un análisis de estadística descriptiva se determinó que la tasa de multiplicación de *Vaccinium corymbosum* aplicando esta técnica fue superior en contraste con la tasa de multiplicación obtenida por el proceso convencional aplicado en la empresa LePlant, debido a que el valor en cuestión se duplicó de 1.8% a 3.4%, garantizando así una mejor eficiencia y mayor producción.
- En relación con lo expuesto al análisis químico del vermicompost podemos determinar que no es viable el emplear los residuos orgánicos del proceso para generar un abono debido a que los porcentajes de los macronutrientes N, P y K (0.81, 0.34, 0.66 %), respectivamente, son bajos por lo que no brindaría la cantidad de nutrimentos necesarios al suelo y, por tanto, a las plantas que crezcan en él; mas no se puede obviar que los valores tanto de materia orgánica MO (22.33%), carbono orgánico (12.95%), y la relación C/N (16.0474), se encontraron en niveles considerablemente buenos por lo que se optaría en utilizar este producto como enriquecedor de sustratos y se brindaría a LePlant una solución para el manejo de estos residuos.

RECOMENDACIONES

- Realizar el proceso de desinfección cuidadosamente y empleando la solución de cloro Cl adecuada tanto en los biorreactores y las mangueras, con el fin de eliminar y prevenir la formación de colonias bacterianas y fúngicas que a futuro perjudicaran la experimentación.
- Comprobar la viabilidad del sistema en biorreactores, teniendo en cuenta los materiales empleados ya que el uso de ciertos productos como el aluminio pueden generar oxidación y las posibles fugas tanto de medio de cultivo como de aire ocasionaran problemas de contaminación a corto plazo.
- Trabajar con plántulas *in vitro* que provengan de un cultivo totalmente sano y cien por ciento libre de patógenos para garantizar el éxito en la experimentación y reducir el período de tiempo, dejando de lado procesos de contaminación del proceso.
- Utilizar el producto final del proceso de vermicultura como opción de integrado de sustratos en la agricultura u otra línea de producción de la empresa de cultivo de tejidos vegetales LePlant.

BIBLIOGRAFÍA

ADELBERG, Jeffrey. "SIVB 2003 Congress Symposium Proceeding: Plant Growth and Sugar Utilization in an Agitated, Thin-Film Liquid System for Micropropagation". *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 2004, vol. 40, pp. 245-250., DOI 10.1079/IVP2003511.

ALAÑA CASTILLO, Tania Patricia. et al. "DESARROLLO SOSTENIBLE Y EVOLUCIÓN DE LA LEGISLACIÓN AMBIENTAL EN LAS MIPYMES DEL ECUADOR". *Revista Universidad y Sociedad*, 2017, vol. 9, no 1, pp. 91-99., ISSN 2218-3620.

ÁNGEL-MOLINA, J.X. et al. "Evaluación de dos métodos de micropropagación masal en piña (*Ananas comosus* L. Merr.) variedad Golden". *Revista Agrociencia - Revista de contenido científico de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador*, 2018, vol. 1, no 4 SE-Artículos, pp. 48-57.,

ARREDONDO, Clara., DISEÑO Y AUTOMATIZACIÓN DE UN BIORREACTOR PARA SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL. Universidad Autónoma del Estado de México,. S.l.: 2019.

ARROYO, Flavio. "La Economía Circular Como Factor De Desarrollo Sustentable Del Sector Productivo". *INNOVA Research Journal*, 2018, vol. 3, no 2477-9024, pp. 78-98.,

AZÚA, Ramón., "DISEÑO Y AUTOMATIZACIÓN DE UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL PARA ACELERAR EL CRECIMIENTO DE PLANTAS". Escuela Superior Politécnica del Litoral,. S.l.: 2017.

BALDOMERO, Nicolás. et al. "MANEJO AGRONÓMICO DEL CULTIVO DE ARÁNDANO (*Vacciniumcorymbosum*L.) EN LA SIERRA NORTE DE OAXACA". *Universidad y Ciencia* [en línea]. [Consulta: 23 marzo 2021]. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/287219541.pdf>.

CALISAYA, Daniel. & ESPINOZA, Gilda., 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,. S.l.: 2014.

CAMPOSANO, María. & IBARRA, Christopher., Desarrollo de un Prototipo de Sistema de Inmersión Temporal utilizando Nicotiana Tabacum como modelo experimental. Universidad de las Américas,. S.l.: 2019.

CÁRDENAS, Angélica., Validación y desarrollo de una tecnología para la multiplicación in vitro de Paulownia elongata, Paulownia fortunei y un híbrido (P. fortunei x P. elongata) bajo sistemas de propagación convencional e inmersión temporal. UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA SEDE QUITO,. S.l.: 2015.

CÁRDENAS, Michelle. "Los beneficios del arándano, una fruta que toma fuerza en Ecuador". *El metro*. 2019.

CASTILLO, Alicia E. et al. "CARACTERIZACION QUIMICA Y FISICA DE COMPOST DE LOMBRICES ELABORADOS A PARTIR DE RESIDUOS ORGANICOS PUROS Y COMBINADOS". *Agricultura TÃ\copyrightcnica*, 2000, vol. 60, pp. 74-79., ISSN 0365-2807.

CASTILLO, Ana. et al. "EFICIENCIA DEL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL FRENTE AL METODO DE PROPAGACION CONVENCIONAL IN VITRO". *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 2020, vol. 3, no 2631-2662, pp. 175-176.,

CHAVEZ, Álvaro. & RODRIGUEZ, Alejandra. "Aprovechamiento de residuos orgánicos agrícolas y forestales en Iberoamérica". *Academia y Virtualidad*, 2016, vol. 9, no 2011-0731,

CLEGG, Miriam E. et al. "The addition of raspberries and blueberries to a starch-based food does not alter the glycaemic response.". *The British journal of nutrition*, 2011, vol. 106, no 3, pp. 335-338., ISSN 1475-2662 (Electronic). DOI 10.1017/S0007114511001450.

COHEN, D. *Application of micropropagation methods for blueberries and tamarillos*. 1980. S.l.: s.n.

DAS, Quail. et al. "Potential of berry extracts to control foodborne pathogens". *Food Control*, 2017, vol. 73, pp. 650-662., ISSN 0956-7135. DOI <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.09.019>.

DEBNATH, Samir C. "Temporary immersion and stationary bioreactors for mass propagation of true-to-type highbush, half-high, and hybrid blueberries (Vaccinium spp.)". *The Journal of*

Horticultural Science and Biotechnology, 2017, vol. 92, no 1, pp. 72-80., ISSN 1462-0316. DOI 10.1080/14620316.2016.1224606.

DELEGACIÓN DEL MEDIO AMBIENTE Y SERVICIOS DE LA CIUDAD. "Manual básico para hacer vermicompostaje". [en línea]. [2017] Disponible en: http://www.compostaenred.org/documentacion/Manuales/2Manual_Vermicompostaje_SanSebastiandelosReyes.pdf.

DELGADO ARROYO, Ma. del Mar. et al. "Efecto de la vermicultura en la descomposición de residuos orgánicos". *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 2004, vol. 20, no 2, pp. 83-86., ISSN 0188-4999.

DURÁN, Lolita. & HENRÍQUEZ, Carlos. "Caracterización química, física y microbiológica de vermicompostes producidos a partir de cinco sustratos orgánicos". *Agronomía Costarricense*, 2007, vol. 31, no 1, pp. 41-51., ISSN 0377-9424.

EGAS, Mario. "Ecuador emprende producción de arándanos para consumo interno.". *El Telégrafo*. Quito, 2018.

EL HERALDO. "Talleres para conocer la producción de arándanos". *El Heraldito*. Ambato, 2020.

ETIENNE, H. & BERTHOULY, M. "Temporary immersion systems in plant micropropagation". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2002, vol. 69, no 3, pp. 215-231., ISSN 1573-5044. DOI 10.1023/A:1015668610465.

FERNÁNDEZ, Oscar. "Código Electrónica". *Que es un plc siemens logo* [en línea]. [Consulta: 27 mayo 2021]. Disponible en: <http://codigoelectronica.com/blog/que-es-un-plc-siemens-logo>.

FOLADORI, Guillermo. & TOMMASINO, Humberto. "El concepto de desarrollo sustentable treinta años después". *Desenvolvimento e Meio Ambiente*, 2005, vol. 1, DOI 10.5380/dma.v1i0.3056.

FRETT, JOHN J. & SMAGULA, JOHN M. "IN VITRO SHOOT PRODUCTION OF LOWBUSH BLUEBERRY". *Canadian Journal of Plant Science*, 1983, vol. 63, no 2, pp. 467-472., ISSN 0008-4220. DOI 10.4141/cjps83-054.

GARCÍA, Mariano. et al., Biotecnología Alimentaria. S.l.: LIMUSA,. 2004. ISBN 968-18-4522-6.

GARZA, Esthela. "De las teorías del desarrollo al desarrollo sustentable. Historia de la construcción de un enfoque multidisciplinario". *Trayectorias: revista de ciencias sociales de la Universidad Nacional de Nuevo León*, 2007, vol. 25, pp. 45-60., ISSN 1405-8928.

GEORGIEVA, M. et al. "IN VITRO PROPAGATION OF WILD BULGARIAN SMALL BERRY FRUITS (BILBERRY, LINGONBERRY, RASPBERRY AND STRAWBERRY)". *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 2016, vol. 22, pp. 46-51.,

GONTIER, Eric. et al. *Hvoslef-Eide Walter Preil 2005*. 26 enero 2013. S.l.: s.n.

GONZÁLEZ, Patricia. "El arándano, un fruto de reciente producción en el país". *Revista Líderes*, 2018,

HERNÁNDEZ, Lucia. "Presión hidrostática y Principio de Pascal". *UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO* [en línea]. [Consulta: 12 marzo 2021]. Disponible en: https://www.uaeh.edu.mx/docencia/P_Presentaciones/prepa_ixtlahuaco/2017/optica.pdf.

HERNÁNDEZ, Roberto. et al., METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN. Sexta. México D.F: McGRAW-HILL,. 2014. ISBN 978-1-4562-2396-0.

HOORNWEG, Daniel. & BHADA-TATA, Perinaz. "What a Waste : A Global Review of Solid Waste Management". *Urban development series;knowledge papers*, 2012, vol. 15,

JIMÉNEZ-BONILLA, Vilma. et al. "Protocolo de micropropagación de arándano nativo de Costa Rica (*Vaccinium consanguinium*)". *Revista Tecnología en Marcha*, 2018, vol. 31, no 1, pp. 146., ISSN 2215-3241. DOI 10.18845/tm.v31i1.3504.

LEÓN, José. "Variedad Biloxi no se sembraría en las nuevas áreas de arándanos que se instalarán en nuestro país". *agraria.pe* [en línea]. Disponible en: <https://agraria.pe/noticias/variedad-biloxi-no-se-sembraria-en-las-nuevas-areas-de-arand-16933>.

LePlant. Tecnología - Propagación in vitro. *LePlant tecnología en Plantas*. [En línea]. [Consulta: 03 mayo 2021]. Disponible en: <https://www.leplant.com/tecnologia.html>.

MCALISTER, B. et al. "Use of the temporary immersion bioreactor system (RITA®) for production of commercial Eucalyptus clones in Mondi Forests (SA)". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2005, vol. 81, no 3, pp. 347-358., ISSN 1573-5044. DOI 10.1007/s11240-004-6658-x.

MURASHIGE, Toshio. & SKOOG, Folke. "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures". *Physiologia Plantarum*, 1962, vol. 15, no 3, pp. 473-497., ISSN 0031-9317. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.

NIKOLAEVA-GLOMB, Lubomira. et al. "In vitro antiviral activity of a series of wild berry fruit extracts against representatives of Picorna-, Orthomyxo- and Paramyxoviridae.". *Natural product communications*, 2014, vol. 9, no 1, pp. 51-54., ISSN 1934-578X (Print).

PATTEN, Mildred. & NEWHART, Michelle., Understanding research methods: An overview of the essentials, tenth edition. S.l.: s.n. 2017. ISBN 9781315213033.

PIEDRA, María., EVALUACIÓN DE LA MICROTUBERIZACIÓN DE LOS CULTIVARES DE PAPA INIAP - VICTORIA Y SUPERCHOLA, BAJO SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL. Universidad Central del Ecuador,. S.l.: 2014.

QUINTERO-GARCÍA, Oscar Darío. & JARAMILLO-VILLEGAS, Sonia. "Rescate y germinación in vitro de embriones inmaduros de cedro negro (*Juglans neotropica* Diels)". *Acta Agronomica*, 2012, vol. 61, pp. 52+., ISSN 01202812.

ROCA, William. & MROGINSKI, Luis., Cultivo de Tejidos en la Agricultura Fundamentos y Aplicaciones. Cali: CiAT,. 1991. ISBN 958-9183-15-8.

ROSS, S. & CASTILLO, A. "Mass propagation of *Vaccinium corymbosum* in bioreactors". *Agrociencia (Uruguay)*, 2009, vol. 13, no 2, pp. 1-8., ISSN 2301-1548. DOI 10.2477/vol13iss2pp1-8.

SÁNCHEZ, Javier. & DAQUINTA, Marcelo. "MULTIPLICACIÓN IN VITRO DE BROTES DETRES VARIETADES DE CALLAS (*Zantedeschia* sp.) EMPLEANDO SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL". *Ciencia y tecnología*, 2010, vol. 3, pp. 1-5.,

SCHULER, Ingrid. et al. "Propagación in vitro de material seleccionado de *Tabebuia rosea* (Bertol.) DC. (Ocobo) y *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav.) Oken (Nogal Cafetero)*". *Revista Colombiana de Biotecnología*, 2005, vol. 7,

SIGARROA-RIECHE, Alina Katil. & GARCÍA-DELGADO, Claudia Lucía. "Establecimiento y multiplicación in vitro de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth.) variedad sin espinas, mediante ápices meristemáticos". *Acta Agronómica*, 2011, vol. 60, no 4, pp. 347-354., ISSN 0120-2812.

SINMALEZA, Karen. & GRIJALVA, Jeanely., DETERMINACIÓN DE CONDICIONES ÓPTIMAS PARA EL CULTIVO IN VITRO DE *NICOTIANA TABACUM* CON MIRAS AL DESARROLLO DE UN PROTOTIPO DE SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL. Universidad de las Américas,. S.l.: 2018.

STEINGROEWER, Juliane. et al. "Bioprocessing of differentiated plantin vitro systems". *Engineering in Life Sciences*, 2013, vol. 13, pp. 26-38., DOI 0.1002/elsc.201100226.

STEWART, F.C. et al. "Investigations on Growth and Metabolism of Plant Cells: I. New Techniques for the Investigation of Metabolism, Nutrition and Growth in Undifferentiated Cells". *Annals of Botany*, 1952, vol. 16, no 1, pp. 57-79., ISSN 0305-7364. DOI 10.1093/oxfordjournals.aob.a083303.

SUTHAR, Surendra. "Vermicomposting potential of *Perionyx sansibaricus* (Perrier) in different waste materials". *Bioresource Technology*, 2007, vol. 98, no 6, pp. 1231-1237., ISSN 0960-8524. DOI <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.008>.

TORTOSA, German. "La Historia del Compostaje". *COMPOSTANDO CIENCIA LAB. Divulgación científica sobre agricultura y medio ambiente* [en línea]. [Consulta: 20 febrero 2021]. Disponible en: <http://www.compostandociencia.com/2019/01/the-compost-story-la-historia-del-compost/>.

VILLA, Christian., PROYECTO DE FACTIBILIDAD PARA PRODUCCIÓN Y EXPORTACIÓN DE JUGO NATURAL DE ARÁNDANO AL MERCADO ÁRABE. Escuela Superior Politécnica del Ejército,. S.l.: 2013.

VILLEGAS, Víctor. & CANEPA, José. "Vermicompostaje: I avances y estrategias en el tratamiento de residuos sólidos orgánicos". *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 2017, vol. 8, pp. 393., DOI 10.29312/remexca.v8i2.59.

WERNER, Sören. et al., Bioreactor technology for sustainable production of plant cell- and tissue-derived products. ZHAW Zurich University of Applied Sciences,. S.l.: 2018.

WINKELMANN, Traud. et al. "Commercial in vitro plant production in Germany in 1985–2004". *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2006, vol. 86, pp. 319-327., DOI 10.1007/s11240-006-9125-z.

ZAPATA, Christian., EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE EXPLANTES DE MORA SIN ESPINA "Rubus glaucus Benth" EN LA FASE DE MULTIPLICACIÓN VEGETATIVA EN UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL. Escuela Superior Politecnica del Ejército,. S.l.: 2014.

ZÚÑIGA, Marcela. et al., Sistema de Inmersión Temporal en Especies Anuales, Frutales y Vides. Ograma Ltd. Santiago: s.n. 2009.

**LEONARDO FABIO
MEDINA NUSTE**

 Firmado digitalmente por LEONARDO
FABIO MEDINA NUSTE
Fecha: 2021.10.22 11:43:34 -05'00'

ANEXOS

ANEXO A: AVAL DE LA INVESTIGACIÓN



LePlant
Tecnología en Plantas

Ambato 8 de diciembre de 2020

Doctor

Fausto Yaulema

Presidente de la Integración Curricular de Titulación y Director de Carrera de Ingeniería Ambiental

Presente . _

Mediante la presente, tengo a bien informar en calidad de Gerente de Producción del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales *in vitro* LePlant, que las señoritas Yanira Nathaly Rojas Buenaño con cédula de identidad 1600468688 y Janina Ximena Goyes Tixi con cédula de identidad 0202133252, estudiantes de la Facultad de Ciencias, carrera de Biotecnología Ambiental realizarán el trabajo de titulación (tipo: proyecto de investigación) cuyo título es: ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA PROPAGACIÓN *in vitro* DE *Vaccinium corymbosum* (ARÁNDANO AZUL) EMPLEANDO LA TÉCNICA DE INMERSIÓN TEMPORAL EN BIORREACTORES EN EL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES LEPLANT.

El proyecto de investigación será supervisado por la Gerente de Producción de la empresa, la Ingeniera M.Sc., Paola Rivera, desde diciembre del 2020 hasta mayo del 2021. De igual forma la empresa LePlant se compromete a financiar el proyecto de investigación.

Por lo tanto otorgo el **AVAL DE APROBACIÓN** para la realización del trabajo de titulación de las estudiantes anteriormente mencionadas.

Sin otro particular, saludo a usted atentamente, con las consideraciones más distinguidas.

Atentamente:



Paola Rivera

Gerente de Producción LePlant



web: www.leplant.com / mail: info@leplant.com / cel: 084511089

Realizado por: LePlant, 2020.

ANEXO B: MATRIZ DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ENSAYO UNO, EN LA FASE DE MULTIPLICACIÓN EN EL SIT 1 CON UN TIEMPO DE INMERSIÓN DE UN MINUTO Y FRECUENCIA DE CUATRO HORAS EN UN CICLO DE VEINTICINCO DÍAS

Recolección de Datos SIT #1 (250 ml) (1 min/4horas) Ensayo 1						
N-de Explante	N-de explantes obtenidos	Longitud inicial media (cm)	Longitud final media (cm)	Coficiente de Multiplicación	Tasa de Velocidad de Multiplicación	Tiempo de experimentación (días)
1	3	3.3	7.1	3.401	1.9208	25
2	2					
3	1.63					
4	7					
5	3					
6	4					
7	3					
8	4.5					
9	2					
10	2.13					
11	2.5					
12	6					
13	3					
14	4.38					
15	3					
16	4.63					
17	3					
18	2.5					
19	4					
20	2.75					
	Total					
	68.02					

Realizado por: Goyes, Janina y Rojas, Yanira, 2021.

ANEXO C: MATRIZ DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ENSAYO DOS, EN LA FASE DE MULTIPLICACIÓN EN EL SIT 1 CON UN TIEMPO DE INMERSIÓN DE TRES MINUTOS Y FRECUENCIA DE SEIS HORAS EN UN CICLO DE VEINTICINCO DÍAS

Recolección de Datos SIT #1 (250 ml) (1 min/4horas) Ensayo 2						
N-de Explante	N-de explantes obtenidos	Longitud inicial media (cm)	Longitud final media (cm)	Coficiente de Multiplicación	Tasa de Velocidad de Multiplicación	Tiempo de experimentación (días)
1	4	2.9	6.8	3.33125	1.865	25
2	3.3775					
3	1.75					
4	3.25					
5	5					
6	4					
7	6.25					
8	3					
9	4					
10	2.5					
11	3					
12	3.125					
13	4					
14	3					
15	3					
16	3.25					
17	2					
18	2.125					
19	4.25					
20	1.75					
	Total					
	66.63					

Realizado por: Goyes, Janina y Rojas, Yanira, 2021.

ANEXO D: MATRIZ DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ENSAYO TRES, EN LA FASE DE MULTIPLICACIÓN EN EL SIT 1 CON UN TIEMPO DE INMERSIÓN DE TRES MINUTOS Y FRECUENCIA DE SEIS HORAS EN UN CICLO DE VEINTICINCO DÍAS

Recolección de Datos SIT #1 (250 ml) (1 min/4horas) Ensayo 3						
N-de Explante	N-de explantes obtenidos	Longitud inicial media (cm)	Longitud final media (cm)	Coefficiente de Multiplicación	Tasa de Velocidad de Multiplicación	Tiempo de experimentación (días)
1	4	3.1	7.2	3.476	1.9808	25
2	3.25					
3	4.25					
4	3.13					
5	5					
6	3.13					
7	5					
8	3.5					
9	2.13					
10	4					
11	2.5					
12	4					
13	2.5					
14	3.25					
15	1.5					
16	2.63					
17	5.5					
18	3.5					
19	4					
20	2.75					
	Total					
	69.52					

Realizado por: Goyes, Janina y Rojas, Yanira, 2021.

ANEXO E: MATRIZ DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA FASE DE MULTIPLICACIÓN EN EL SIT 2 CON UN TIEMPO DE INMERSIÓN DE TRES MINUTOS Y FRECUENCIA DE SEIS HORAS EN UN CICLO DE VEINTICINCO DÍAS

Recolección de Datos SIT #2 (300 ml) (3 min / 6horas) Ensayo 1						
N-de Explante	N-de explantes obtenidos	Longitud inicial media (cm)	Longitud final media (cm)	Coefficiente de Multiplicación	Tasa de Velocidad de Multiplicación	Tiempo de experimentación (días)
1	4	3.1	6.6	1.9905	0.7924	25
2	1.13					
3	1.38					
4	1.25					
5	1.63					
6	1.38					
7	1.25					
8	1.25					
9	1.38					
10	3					
11	4					
12	3.38					
13	3.13					
14	1.25					
15	1.88					
16	1.63					
17	2.13					
18	1.38					
19	1.38					
20	2					
	Total					
	39.81					

Realizado por: Goyes, Janina y Rojas, Yanira, 2021.

ANEXO F: MATRIZ DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ENSAYO DOS, EN LA FASE DE MULTIPLICACIÓN EN EL SIT 2 CON UN TIEMPO DE INMERSIÓN DE TRES MINUTOS Y FRECUENCIA DE SEIS HORAS EN UN CICLO DE VEINTICINCO DÍAS

Recolección de Datos SIT #2 (300 ml) (3 min / 6horas) Ensayo 2						
N-de Explante	N-de explantes obtenidos	Longitud inicial media (cm)	Longitud final media (cm)	Coefficiente de Multiplicación	Tasa de Velocidad de Multiplicación	Tiempo de experimentación (días)
1	2	2.8	6.3	1.9465	0.7572	25
2	2.25					
3	1.13					
4	2.5					
5	2.13					
6	1.13					
7	1.25					
8	1.25					
9	2					
10	1					
11	2.12					
12	1.38					
13	2.13					
14	3.4					
15	2					
16	1.63					
17	3.13					
18	1.5					
19	2.25					
20	2.75					
	Total					
	38.93					

Realizado por: Goyes, Janina y Rojas, Yanira, 2021

ANEXO G: MATRIZ DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ENSAYO TRES, EN LA FASE DE MULTIPLICACIÓN EN EL SIT 2 CON UN TIEMPO DE INMERSIÓN DE TRES MINUTOS Y FRECUENCIA DE SEIS HORAS EN UN CICLO DE VEINTICINCO DÍAS

Recolección de Datos SIT #2 (300 ml) (3 min / 6horas) Ensayo 3						
N-de Explante	N-de explantes obtenidos	Longitud inicial media (cm)	Longitud final media (cm)	Coefficiente de Multiplicación	Tasa de Velocidad de Multiplicación	Tiempo de experimentación (días)
1	3	2.9	6.5	2.0095	0.8076	25
2	3.75					
3	2.25					
4	1.63					
5	1.38					
6	2.13					
7	1.13					
8	1.75					
9	1.25					
10	2.13					
11	1.13					
12	2.38					
13	2					
14	1.88					
15	1.38					
16	2.63					
17	2.13					
18	1.63					
19	2.5					
20	2.13					
	Total					
	40.19					

Realizado por: Goyes, Janina y Rojas, Yanira, 2021.

ANEXO H: REGISTRO FOTOGRÁFICO



Disinfección de los explantes



Proceso de Introducción finalizado



Fase de Multiplicación de los explantes



Recopilación de resultados



Instalación del sistema de vermicompost



Proceso de descomposición de residuos

Realizado por: Goyes, Janina y Rojas, Yanira, 2021.

ANEXO I: ANÁLISIS QUÍMICO DEL VERMICOMPOST

MC-LASPA-2201-01



INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS
 ESTACION EXPERIMENTAL SANTA CATALINA
 LABORATORIO DE ANÁLISIS DE SUELOS PLANTAS Y AGUAS
 Panamericana Sur Km. 1. S/N Cutuglagua.
 Tifs. (02) 3007284 / (02)2504240
 Mail: laboratorio.dsa@iniap.gob.ec



INFORME DE ENSAYO No: 21-0618

NOMBRE DEL CLIENTE: Rojas Buenaño Yanira Nathaly
PETICIONARIO: Rojas Buenaño Yanira Nathaly
EMPRESA/INSTITUCIÓN: Rojas Buenaño Yanira Nathaly
DIRECCIÓN: Avenida Alber Einstein y Torricelli

FECHA DE RECEPCIÓN DE MUESTRA:
HORA DE RECEPCIÓN DE MUESTRA:
FECHA DE ANÁLISIS:
FECHA DE EMISIÓN:
ANÁLISIS SOLICITADO:

03/08/2021

15:48

10/08/2021

13/08/2021

Abono 1 + PH+ CE + MO.

N° muestra	N	P	K	Ca	Mg	S	B	Zn	Cu	Fe	Mn	Na ⁺	Cl ⁻	NO ₃	CE	Humedad	Materia orgánica	Carbono orgánico	Ph	C/N	Identificación de la muestra
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	ppm	ms/cm	(%)	(%)	(%)			
21-2471	0,81	0,34	0,66	1,086	0,47	0,21									1,20		22,33	12,95	8,50	16,0474	Muestra 1

OBSERVACIONES: Muestra entregada por el cliente



LABORATORISTA



RESPONSABLE DEL LABORATORIO

Este documento no puede ser reproducido ni total ni parcialmente sin la aprobación escrita del laboratorio.

Los resultados arriba indicados solo están relacionados con el objeto de ensayo

NOTA DE DESCARGO: La información contenida en este informe de ensayo es de carácter confidencial, está dirigido únicamente al destinatario de la misma y solo podrá ser usada por este. Si el lector de este correo electrónico o fax no es el destinatario del mismo, se le notifica que cualquier copia o distribución de este se encuentra totalmente prohibido. Si usted ha recibido este informe de ensayo por error, por favor notifique inmediatamente al remitente por este mismo medio y elimine la información.



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS Y RECURSOS DEL APRENDIZAJE
UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y DOCUMENTAL

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 06 / 09 / 2021

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: <i>Janina Ximena Goyes Tixi</i> <i>Yanira Nathaly Rojas Buenaño</i>
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: <i>Ciencias</i>
Carrera: <i>Ingeniería en Biotecnología Ambiental</i>
Título a optar: <i>Ingeniera en Biotecnología Ambiental</i>
f. Analista de Biblioteca responsable: <i>Ing. Leonardo Medina Ñuste MSc.</i>

**LEONARDO
FABIO MEDINA
NUSTE**

Firmado digitalmente
por LEONARDO FABIO
MEDINA NUSTE
Fecha: 2021.10.06
10:06:28 -05'00'



1818-DBRA-UTP-2021

Correo: JANINA XIMENA GOYES TIXI - Outlook - Google Chrome
outlook.office.com/mail/deeplink
abstract_goyes_&_rojas_.pdf Descargar Imprimir Guardar en OneDrive Ocultar correo electrónico

ABSTRACT

The aim of the current research was the standardization of a protocol for the blueberry (*Vaccinium corymbosum*) in vitro propagation at LePlant company. First of all, Temporary Immersion Systems in Bioreactors (TIS) were used in GL 80 square laboratory flasks, in which operation and contamination tests were carried out; then, twenty explants were put under two treatments, Treatment 1 (1min / 4h-250ml) and Treatment 2 (3min / 6h-300ml) during a twenty five-day period and three biological replications. Once the multiplication rate average values were obtained with the use of TIS, it was possible to compare these values in a statistical way with the ones reported by the company. At the end of the experimentation, the organic waste was put under a biological degradation through the use of vermicomposting. Then, with the use of RStudio software, it was possible to determine a significance level of 0.05 and a confidence of 95% regarding the effectiveness of Treatment 1 over Treatment 2 in terms of sprouts length, rate and multiplication coefficient, this reflects that the frequency and immersion time are directly proportional, it was also concluded that the multiplication rate of 3.4 obtained in the Temporary Immersion Systems, increased approximately twice the value of 1.8 registered in the company during the conventional in vitro process. With regard to the vermicompost chemical analysis, it presented a good C/N ratio as well as a high organic matter content, optimal for being used as substrate supplement. At the end of the experimentation, a protocol for the blueberry in vitro propagation was standardized with

TRADUCCION

BA Biotecnología Ambiental
Mié 20/10/2021 14:03
Para: JANINA XIMENA GOYES TIXI
abstract_goyes_&_rojas_...
328 KB

Lcda. Marlene Durán M
SECRETARIA CARRERA INGENIERÍA
BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL
Escuela Superior Politécnica de Chimborazo
Panamericana Sur Km. 1 1/2
Teléfonos 593 (2) 998200 Ext. 2207
mduran@esPOCH.edu.ec

Responder | Reenviar

Activar Windows
Ver configuración para activar Windows.

Windows Search: Escribe aquí para buscar
Taskbar: .Las suoperencias anteriores son útiles? Sí No
System Tray: 3:22 PM 10/22/2021