

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

**Micropropagación masiva de portainjerto comercial de cerezo
(*Prunus* sp) en un sistema de inmersión temporal**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOTECNOLOGÍA**

AUTORES:

Bach. Castillo Sandoval, Marleni

Bach. Durand Moreno, Ruth Jaqueline

ASESOR:

Ms. Alva Muñoz, Eterio Amaranto

CO-ASESORA:

Blga. Guillen Murrieta, Martha Cecilia

NUEVO CHIMBOTE – PERÚ

2025

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

**Micropropagación masiva de portainjerto comercial de cerezo
(*Prunus* sp) en un sistema de inmersión temporal**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOTECNOLOGÍA**

AUTORES:

Bach. Castillo Sandoval Marleni

Bach. Durand Moreno Ruth Jaqueline

Revisado y aprobado por:

ASESOR: Ms. Alva Muñoz, Eterio
Amaranto
DNI:32406295
ORCID: 0000-0002-4113-7981

CO-ASESORA: Blga. Guillen Murrieta,
Martha Cecilia
DNI: 18166776
ORCID: 0000-0002-9978-9675

NUEVO CHIMBOTE – PERÚ

2025

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

**Micropropagación masiva de portainjerto comercial
de cerezo (*Prunus* sp) en un sistema de inmersión temporal**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOTECNOLOGÍA**

Revisado y Aprobado por el Jurado Evaluador:

Dr. Avalos Ramírez, Yosef Javier
PRESIDENTE
ORCID: 0000-0002-0071-8413
DNI: 18127282

Ms. Villanueva Carlos, José Manuel
SECRETARIO
ORCID: 0000-0002-5056-0001
DNI: 32733772

Ms. Alva Muñoz, Eterio Amaranto
INTEGRANTE
ORCID: 0000-0002-4113-7981
DNI: 32406295

NUEVO CHIMBOTE – PERÚ

2025

ACTA DE CALIFICACION DE SUSTENTACION DE LA TESIS

En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, en el auditorio de la facultad de Ciencias siendo las 16 horas del día 17 de julio dando cumplimiento a la Resolución N° 186-2025-UNS-CFC, se reunió el jurado evaluador presidido por Dr Yosef Javier AVALOS RAMIREZ.

Teniendo como miembros a M Sc José Manuel VILLANUEVA CARLOS (integrante) y M Sc Eterio Amaranto ALVA MUÑOZ (integrante), para la sustentación de tesis a fin de optar el título de licenciado en Biotecnología realizado por las tesis CASTILLO SANDOVAL Marleni y DURAND MORENO, Ruth Jaqueline quienes sustentaron la tesis intitulada **Micropropagación masiva de portainjerto comercial de cerezo (*Prunus sp*) en un sistema de inmersión temporal.**

Terminada la sustentación los tesisas respondieron a las preguntas formuladas por los miembros del jurado

El jurado luego de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes declara la sustentación como **BUENO** asignándole un calificativo de **18** puntos, según artículo 111 del Reglamento General de Grados y Títulos vigente (Resolución N° 580-2002-CU-R-UNS)

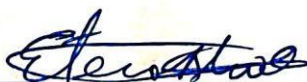
Siendo las 17 horas del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación firmando los miembros del jurado en señal de conformidad



Dr Yosef AVALOS RAMIREZ
Presidente



M Sc José VILLANUEVA CARLOS
Secretario



M Sc Eterio ALVA MUÑOZ
Integrante



Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por **Turnitin**. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Marleni Castillo Sandoval
Título del ejercicio: TESIS // CASTILLO Y DURAND
Título de la entrega: Micropropagación masiva de portainjerto comercial de cerezo...
Nombre del archivo: INFORME_TESIS_CASTILLO_Y_DURAND.pdf
Tamaño del archivo: 4.08M
Total páginas: 111
Total de palabras: 21,757
Total de caracteres: 113,572
Fecha de entrega: 03-sept-2025 06:43p. m. (UTC-0500)
Identificador de la entrega: 2681512631

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA

 **UNS**
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

**Micropropagación masiva de portainjerto comercial de cerezo
(Prunus sp) en un sistema de inmersión temporal**
TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOTECNOLOGÍA

AUTORES:
Bach. Castillo Sandoval Marleni
ORCID: 0009-0007-9950-5314

Bach. Durand Moreno Ruth Jaqueline
ORCID: 0009-0009-2650-5529

ASESOR:
Ms. Alva Muñoz, Eterio Amaranto
DNI: 32406295
ORCID: 0000-0002-5056-0001
NUEVO CHIMBOTE – PERÚ
2025

Micropropagación masiva de portainjerto comercial de cerezo (Prunus sp) en un sistema de inmersión temporal

INFORME DE ORIGINALIDAD

16%	15%	4%	4%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.uns.edu.pe	1 %
	Fuente de Internet	
2	hdl.handle.net	1 %
	Fuente de Internet	
3	aprenderly.com	1 %
	Fuente de Internet	
4	repositorio.cinvestav.mx	1 %
	Fuente de Internet	
5	colposdigital.colpos.mx:8080	1 %
	Fuente de Internet	
6	dspace.ugal.ac.za	1 %
	Fuente de Internet	
7	Submitted to Mahidol University	1 %
	Trabajo del estudiante	
8	Submitted to Imperial College of Science, Technology and Medicine	1 %
	Trabajo del estudiante	
9	ucv.altavoz.net	1 %
	Fuente de Internet	
10	repositorio.espe.edu.ec	< 1 %
	Fuente de Internet	
11	repositorio.urp.edu.pe	< 1 %
	Fuente de Internet	
12	revistas.unc.edu.ar	< 1 %
	Fuente de Internet	
13	mail.agraria.pe	< 1 %
	Fuente de Internet	
14	www.biologia.ucr.ac.cr	< 1 %
	Fuente de Internet	

DEDICATORIA

A Dios, por ser mi guía, mi fortaleza en cada paso
de mi vida y permitirme alcanzar este logro.

A mi madre Angélica, quien con su amor y
dedicación me inculcó valores que me han llevado
a ser la persona que soy, gracias por nunca dudar
de mí y por apoyarme siempre.

A mis hermanos, Aylin y Jairo, por su cariño, alegrar
mis días, y que, a través de este logro, tengan presente
que con esfuerzo y dedicación pueden llegar a cumplir
sus metas.

A mi prima Pilar, quien con sus sabios consejos y
palabras de aliento me ha ayudado a crecer y a mejorar
como persona, gracias por su apoyo y cariño.

Marleni Castillo Sandoval

DEDICATORIA

A Dios por permitirme concluir esta etapa de mi vida.

A mis padres, Carlos y Blanca por brindarme su amor incondicional y apoyo, por ser el ejemplo a seguir e inculcarme el respeto y la humildad, ante todo, gracias por toda su dedicación y amor.

A mis hermanas, Liset y Karla por estar siempre a mi lado en todos los momentos de mi vida, por haberme brindado fortaleza y apoyo en cada decisión tomada.

A Jhunyor, por su amor y motivación para poder alcanzar todos mis sueños y por la alegría que me brinda cada día.

Ruth Durand Moreno

AGRADECIMIENTO

Agradecemos de manera muy especial a nuestra co-asesora, Martha Guillén, por brindarnos las facilidades para el desarrollo de este proyecto y su constante apoyo; su experiencia y conocimiento fueron de gran ayuda.

A nuestro asesor, Eterio Alva Muñoz por aceptar guiarnos en este proceso, por sus consejos, recomendaciones y amabilidad al darnos las facilidades para realizar este proyecto.

Al Dr. Julio Chico por brindarnos sus aportes y experiencias para esta investigación.

A nuestros diversos docentes, por sus enseñanzas y contribuir a nuestro crecimiento profesional.

A nuestras amigas, Alessandra Mendoza y Joselyn Urcia, por su apoyo y aliento constante. Su motivación y confianza en nosotras nos ayudaron a superar obstáculos.

INDICE

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTO.....	III
RESUMEN	IV
ABSTRACT.....	V
I. INTRODUCCIÓN	1
Objetivos:	4
1.1.1. Objetivo General.....	4
1.1.2. Objetivos específicos.....	4
1.2. Formulación de la hipótesis	5
1.3. Justificación e importancia	5
II. MARCO TEORICO.....	7
2.1. Antecedentes.....	7
2.2. Marco conceptual	11
2.2.1. Origen del cerezo.....	11
2.2.2. Portainjertos	11
2.2.3. Características de algunos portainjertos disponibles en Perú	12
2.2.4. Características de algunas variedades de interés comercial	12
2.2.5. Propagación del cerezo	13

2.2.6.	Micropropagación <i>in vitro</i>	13
2.2.7.	Etapas de la micropropagación	14
2.2.8.	Medios de Cultivo	14
2.2.9.	Biorreactores	22
2.2.10.	Tipos de Biorreactores.....	23
III.	METODOLOGÍA	30
3.1.	Lugar donde se ejecutó el proyecto.....	30
3.3.	Operacionalización de variables	30
3.6.	Material vegetal.....	30
3.7.	Preparación y siembra del material vegetal <i>in vitro</i> en medio semisólido.....	31
3.8.	Acondicionamiento y esterilización de los biorreactores PLANT FORM	33
3.9.	Preparación del medio líquido.....	34
3.10.	Siembra en los biorreactores PLANT FORM.....	36
3.11.	Instalación del sistema de inmersión temporal – Biorreactores PLANT FORM	37
3.12.	Evaluación de cada tratamiento	38
3.13.	Diseño experimental.....	38
3.10.	Variables dependientes:	43
3.10.1.	Tasa de multiplicación de brotes (T_m)	43
3.10.2.	longitud de brotes (L_b).....	43
3.10.3.	Área foliar (A_f)	44

3.10.4. Concentración de clorofila (Cc)	45
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
Evaluación de la tasa de multiplicación de los explantes de <i>Prunus</i> sp de cada tratamiento:.....	47
Evaluación de la longitud de tallo de los explantes de <i>Prunus</i> sp de cada tratamiento:	53
Evaluación del área foliar de cada hoja de los brotes por tratamiento:	59
Evaluación de la concentración de clorofila de cada tratamiento en plantform.....	65
V. CONCLUSIONES	71
VI. RECOMENDACIONES.....	72
VII. REFERENCIAS	73
VIII. ANEXOS	82

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Componentes presentes en los medios de cultivo	15
Tabla 2: Ejemplos de PGR utilizados en cultivo in vitro de plantas	19
Tabla 3: Definición de las variables y niveles de estudio	39
Tabla 4: Matriz de experimentos de diseño factorial	40
Tabla 5: Tratamientos y variables independientes (matriz de experimentos)	42
Tabla 6: Evaluación morfológica	46
Tabla 7: Evaluación de la tasa de multiplicación de los explantes de Prunus sp.....	47
Tabla 8: ANOVA de los tratamientos para evaluar la tasa de multiplicación.....	48
Tabla 9: ANOVA del diseño factorial de 4 variables independientes.....	50
Tabla 10: Evaluación de la longitud de tallos de los explantes en cada tratamiento	53
Tabla 11: ANOVA de los tratamientos para evaluar longitud de tallos	55
Tabla 12: ANOVA del diseño factorial de 4 variables independientes para evaluar longitud de tallos.....	56
Tabla 13: Evaluación del área foliar de cada tratamiento	59
Tabla 14: ANOVA de los tratamientos para evaluar el Área foliar.....	61
Tabla 15 : ANOVA del diseño factorial de 4 variables independientes del Area foliar	62
Tabla 16: Contenido de Clorofilas y carotenoides totales en hojas	65
Tabla 17: ANOVA de los 16 tratamientos para evaluar clorofila total.....	67
Tabla 18: ANOVA del diseño factorial de 4 variables independientes de clorofila total.	68

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Modelos de biorreactores de inmersión continua.....	24
Figura 2: Bioreactor RITA.....	26
Figura 3: Sistema tipo Twin Flask	27
Figura 4: Modelos comerciales de SIT	28
Figura 5: Biorreactor modular de inmersión temporal (BioMINT).....	29
Figura 6: Brotes de Cerezo del Banco de Germoplasma – Camposol S.A.....	31
Figura 7: Siembra en Medio Semisólido	32
Figura 8: Piezas del Biorreactor PLANT FORM.....	33
Figura 9: Esterilización de los biorreactores PLANTFORM	34
Figura 10: Preparación de medio líquido.....	35
Figura 11: Dispensado del medio en los biorreactores PLANTFORM	35
Figura 12: Siembra en PLANTFORM.....	36
Figura 13: Instalación de los biorreactores plantform.....	37
Figura 14: Comparación de tratamientos de la tasa de multiplicación.....	48
Figura 15: Comparación de medias - método Tukey HSD.....	49
Figura 16: Representa la combinación sugerida T7.....	51
Figura 17: Comparación de tratamientos de longitud de tallos.....	54
Figura 18: Comparación de medias – Método de Tukey HSD	55
Figura 19: Representación de la combinación sugerida T13.....	57
Figura 20: Comparación de tratamientos – Área foliar.....	60
Figura 21: Comparación de medias del Area foliar -Método Tukey HSD	61

Figura 22: Comparación de medias del Area foliar -Método Tukey HSD63

Figura 23: Comparación de tratamientos por clorofila total66

Figura 24: Comparación de medias- método tukey y diferencias en medias de clorofila
total67

Figura 25: Representación de la combinación sugerida T6.....69

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Medio de cultivo semisólido	82
Anexo 2: Medio de cultivo líquido (testigo) en SIT	82
Anexo 3: Evaluación morfológica de los brotes por cada tratamiento	83
Anexo 4: Registros de datos de todas las variables dependientes	87
Anexo 5: Matriz de consistencia	89
Anexo 6: Operacionalización de las variables.....	91

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue desarrollar un protocolo eficiente para la micropropagación masiva de un portainjerto comercial de cerezo (*Prunus* sp.), empleando diferentes concentraciones de hormonas en un sistema de inmersión temporal (SIT) con medio de cultivo líquido Driver–Kuniyuki (DKW). Se utilizó un diseño experimental factorial con cuatro variables independientes: concentración de IBA, concentración de BAP, tiempo y frecuencia de inmersión, cada una con dos niveles, lo que resultó en un total de 16 tratamientos. Tras 25 días de evaluación, el tratamiento T7 (IBA 0.1 mg/L, BAP 1 mg/L, inmersión de 6 minutos cada 12 horas) fue identificado como el más eficiente. Este resultado se comparó con una micropropagación convencional in vitro (TC) y un testigo (T0) bajo SIT. El método convencional (TC) mostró una tasa de multiplicación de 0.4 plantas por explante, una concentración de clorofila total de 18.6 mg/g.m.s., un área foliar de 0.6 cm² y una longitud de brote de 2.6 cm. El tratamiento T0, por su parte, alcanzó 2 plantas por explante, una concentración de clorofila total de 8.6 mg/g.m.s., un área foliar de 1 cm² y una longitud de brote de 2 cm. Ambos tratamientos mostraron una baja tasa de multiplicación en comparación con el tratamiento T7, que alcanzó 4.5 plantas por explante, un área foliar de 1 cm², una longitud de brote de 2.8 cm y una concentración de clorofila total de 19.8 mg/g.m.s. Además, en la evaluación cualitativa, T7 se ubicó en la categoría 5, lo que indica que las plantas presentaron excelente vigor y un estado saludable. Estos resultados proponen al tratamiento T7 como una alternativa viable y eficiente para la micropropagación masiva in vitro de *Prunus* sp., mediante el uso de un sistema de inmersión temporal controlado, con aplicaciones potenciales tanto para productores como para futuras investigaciones orientadas al mejoramiento de la productividad de este cultivo.

Palabras clave:

micropropagación, cerezo, inmersión temporal, *Prunus* sp, cultivo *in vitro*, fitohormonas

ABSTRACT

The objective of this research was to develop an efficient protocol for the mass micropropagation of a commercial cherry (*Prunus* sp.) rootstock, using different concentrations of hormones in a temporary immersion system (SIT) with Driver-Kuniyuki liquid culture medium (DKW). A factorial experimental design was used with four independent variables: IBA concentration, BAP concentration, immersion time and frequency, each with two levels, resulting in a total of 16 treatments. After 25 days of evaluation, treatment T7 (IBA 0.1 mg/L, BAP 1 mg/L, 6-minute immersion every 12 hours) was identified as the most efficient. This result was compared with a conventional in vitro micropropagation (CT) and a control (T0) under SIT. The conventional method (CT) showed a multiplication rate of 0.4 plants by explant, a total chlorophyll concentration of 18.6 mg/g.m.s, a leaf area of 0.6 cm² and a shoot length of 2.6 cm. Treatment T0, on the other hand, achieved 2 plants per explant, a total chlorophyll concentration of 8.6 mg/g.m.s, a leaf area of 1 cm² and a shoot length of 2 cm. Both treatments showed a low multiplication rate compared to treatment T7, which reached 4.5 plants per explant, a leaf area of 1 cm², a shoot length of 2.8 cm and a total chlorophyll concentration of 19.8 mg/g.m.s. Furthermore, in the qualitative evaluation, T7 was placed in category 5, indicating that the plants showed excellent vigor and a healthy state. These results propose T7 treatment as a viable and efficient alternative for massive in vitro micropropagation of *Prunus* sp. using a controlled temporary immersion system, with potential applications both for growers and for future research aimed at improving the productivity of this crop.

Key words:

micropropagation, cherry, temporary immersion, *Prunus* sp, in vitro culture, phytohormones.

I. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años, el cultivo del cerezo ha logrado un importante crecimiento, por su alto contenido de vitaminas, antioxidantes y minerales. Uno de los mayores consumidores de cereza es el mercado chino y tiene a Chile como su principal país abastecedor. En la temporada 2023-2024 Chile exportó 413.979 toneladas de cerezas y en los últimos 7 años ha crecido en un promedio de 29% al año en volumen. (Smartcherry. 2024), como respuestas favorables de condiciones del mercado externo que introdujeron nuevas variedades y portainjertos para reducir el crecimiento vegetativo e inducir una rápida entrada en producción. (Cáceres Arancibia, 2004).

Actualmente, en el Perú no hay áreas de producción de cereza y la entidad gubernamental exportadora recién está empezando a promover su cultivo por su alta demanda y rentabilidad que genera oportunidades comerciales (Castro et al., 2020). En la costa y sierra del país las grandes y medianas empresas han empezado a realizar investigaciones desde el año 2017, ensayando combinaciones de variedades y portainjertos (Ortiz, 2024), las zonas climáticas que son favorables para el cultivo son: Cajamarca, Huaraz, sierra de Lima, Junín, Cusco y Arequipa. (Vinelli, 2017 y Castro et al., 2020).

Por lo tanto, las plantaciones de cerezo que se necesitan por hectárea son dependiendo de varios factores, como; la variedad, el sistema de cultivo (tradicional o intensivo), el tipo de portainjerto y las condiciones locales del suelo y clima. En sistemas de cultivo tradicional se necesita entre 200 a 400 árboles de cerezo en cambio en un sistema de cultivo intensivo se necesita entre 1000 a 2000 plantas de cerezo por hectárea, y conseguir estas cantidades de plantas libre de virus y de enfermedades; ya sean portainjertos o variedades, es todo un reto (Subercaseaux, 2019).

El cultivo agronómico para un sistema de cultivo intensivo de árboles frutales como el cerezo, requiere de plantas injertadas que se forman en dos partes: la aérea que se encuentra la variedad y la raíz que está formada por el portainjerto. En efecto a la oferta de numerosos patrones y la necesidad de establecer explotaciones perennes, resulta fundamental un cuidadoso análisis en la elección del portainjerto para cada variedad y condición de cultivo. El cerezo es poco precoz y se ha investigado para resolver su falta de precocidad, mediante la selección de portainjertos que controlan el crecimiento vegetativo (Tacchini, 2015).

Algunos de los portainjertos de cerezo que se están utilizando comercialmente es el portainjerto Colt, que es de tamaño pequeño, y está más relacionado con una gran cantidad de variedades de cerezos, además el portainjerto es propagado vegetativamente por yemas o estacas debido a su estructura genética heterocigótica (Tacchini, 2015).

Pero para responder la alta demanda de portainjertos ha sido necesario usar la técnica de micropropagación que es un sistema de propagación asexual que se selecciona una parte de la planta madre ya sean segmentos, yemas, hojas o meristemas, que da como resultado plantas genéticamente idénticas, debido a la totipotencialidad. (Ramos, 2012). Además, se obtienen plantas libres de enfermedades, especialmente de virosis. Este sistema de micropropagación ha ayudado a aquellos portainjertos difíciles de propagar a través de otros métodos como son el enraizamiento por estacas o la propagación por semillas. (Cáceres, 2004).

Entre otras desventajas de la propagación mediante las técnicas de estacas e injertos; está el desarrollo lento de la planta, requieren mayor espacio y tiempo, riesgo de transferir enfermedades y plagas, riesgo de variabilidad genética, riesgo de incompatibilidad (Gárate, 2010).

Los resultados de las investigaciones establecen que las plantas micropropagadas producen frutos más limpios y de mayor tamaño, peso y homogeneidad. (Barrero, 2009). A pesar que la micropropagación *in vitro* convencional tenga sus beneficios, este sistema tiene la desventaja de un alto costo por planta que en ocasiones supera los US\$1 debido a los costos en mano de obra, utilizan agar u otro agente gelificante, más espacio y materiales (envases). Por ello, solo se utiliza en especies vegetativamente propagadas con alto retorno económico. Es crucial desarrollar y aplicar tecnologías que reduzcan los costos de producción. (Paredes, 2025).

El “Sistema de Inmersión Temporal” en bioreactores es una alternativa a la micropropagación convencional. Consiste en separar los explantes y el medio de cultivo en diferentes contenedores, transfiriendo al medio de manera automática a las plantas en intervalos controlados facilitando la producción a gran escala en un menor tiempo (Castillo, Moreno y García, 2020) además, tiene una mejor oxigenación, hay más contacto directo con el nutriente y reduce la acumulación de gases tóxicos, problemas más comunes que existen en sistemas convencionales. Incluso los SIT ayudan a reducir los costos de producción por planta entre un 50% y 60%; ya que reducen costos en mano de obra, no utilizan agentes gelificantes, mejoran la calidad de las plantas, incrementa la tasa de multiplicación y genera mayor sobrevivencia en la etapa de aclimatación. (Castillo et al. 2020).

En el Perú, actualmente se están realizando ensayos de campo para producir cerezas, pero aún no se ha logrado establecer una producción comercial significativa. Varias empresas agroexportadoras como Camposol S.A., Complejo agroindustrial Beta, Agrokasa entre otras, están desarrollando pruebas en diferentes regiones del país, incluyendo la costa y la

sierra. Sin embargo, para seguir impulsando este nuevo cultivo y llegar a una producción comercial se necesita producir mayor cantidad de portainjertos de alta calidad y superar las desventajas de los métodos de propagación tradicional. De acuerdo con esta realidad, nos planteamos dar solución a este problema, empleando un sistema de inmersión temporal para la micropropagación masiva de portainjerto comercial de cerezo (*Prunus* sp); determinando las concentraciones de fitohormonas en el medio de cultivo líquido y los parámetros físicos como el tiempo y frecuencia de inmersión. (Castro et al., 2020 y Agencia agraria de noticias, 2024).

En relación a lo descrito planteamos el siguiente problema ¿Cuál es la relación de Ácido Indol-3-Butírico (IBA): 0.1, 0.5 mg/l y Bencilaminopurina-6 (BAP): 0.5, 1 mg/l, además del tiempo: 4 y 6 min, y frecuencia de inmersión: 12 y 24 h; que producirá la mayor tasa de multiplicación, longitud de brotes, área foliar y concentración de clorofila; para el portainjerto *Prunus* sp en un sistema de inmersión temporal?

Objetivos:

1.1.1. Objetivo General

- Micropropagar masivamente portainjerto comercial de cerezo (*Prunus* sp) en un sistema de inmersión temporal (SIT).

1.1.2. Objetivos específicos

- Optimizar el tiempo y frecuencia de inmersión que estarán expuestos los explantes en SIT.
- Determinar las concentraciones óptimas de IBA y BAP en medio líquido.
- Calcular la tasa de multiplicación.

- Evaluar el área foliar de los explantes.
- Evaluar la longitud de brotes.
- Medir la concentración de clorofila de las hojas producidas en Sistema de Inmersión Temporal.

1.2. Formulación de la hipótesis

Hi: La relación de Ácido Indol-3-Butírico (IBA) 0.5 mg/l y Bencilaminopurina-6 (BAP) 1 mg/l para el portainjerto *Prunus* sp producirá una mayor tasa de multiplicación, longitud de brotes, área foliar, y concentración de clorofila; en un sistema de inmersión temporal con tiempo y frecuencia de inmersión de 4 min y 12 h respectivamente.

Ho: La relación de Ácido Indol-3-Butírico (IBA) 0.5 mg/l y Bencilaminopurina-6 (BAP) 1 mg/l para el portainjerto *Prunus* sp. no producirá una mayor tasa de multiplicación, longitud de brotes, área foliar, y concentración de clorofila; en un sistema de inmersión temporal con tiempo y frecuencia de inmersión de 4 min y 12 hr respectivamente.

1.3. Justificación e importancia

En Perú, la producción de cerezas aún se encuentra en una etapa inicial, pero su rentabilidad y potencial exportador la convierten en un cultivo atractivo para los productores peruanos. Sin embargo, se deben superar las dificultades en la micropropagación masiva de portainjerto comercial de cerezo (*Prunus* sp), por ello, empleando tecnología eficiente y rentable como el uso de sistemas de inmersión temporal y complementado con las combinaciones adecuadas de fitohormonas y los parámetros

físicos como el tiempo y frecuencia de inmersión, se puede obtener óptimos resultados en la producción masiva de portainjertos.

Los portainjertos de cerezo son importantes en la industria frutícola y los desafíos vinculados a la propagación masiva de plantas leñosas convierten a los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) como la mejor alternativa; para aumentar la producción de portainjertos de alta calidad y reducir la dependencia de material importado. Asimismo, mejorar la competitividad de los productores peruanos en el mercado nacional e internacional y generar beneficios económicos y sociales. Los SIT disponen de tecnología semiautomatizada o automatizadas; lo cual es una novedosa y efectiva innovación en el cultivo de tejidos vegetales (Delfino et al. 2020).

En China, las cerezas, es una de sus principales frutas que consume, este país cuenta con más de mil millones de habitantes, lo que impulsa la tendencia global de alimentos saludables como tradiciones y culturales. Durante las festividades, especialmente en el Año Nuevo Chino es común regalar cestas de fruta de color rojo, que simbolizan prosperidad y buena suerte. Esto hace que la cereza sea una opción atractiva para los consumidores chinos, debido a su perfil nutricional y su significado cultural.

El cerezo es un fruto rentable y a futuro debería estar en la canasta peruana agroexportadora, así como lo es el arándano en la actualidad. El precio del arándano en el mercado internacional en promedio está US\$ 8 el kilo, mientras que la cereza está US\$ 12. Pero, en octubre y noviembre, el precio de la cereza en la China alcanza los US\$ 80 o US\$ 120 el kilo. Lo ideal sería cosechar octubre o noviembre, donde no hay oferta en el mercado internacional, el principal exportador mundial de cerezas frescas fue Chile en el 2020, con despachos por US\$ 1.620 millones, concentrando el 41.3% del total. Otros exportadores son Hong Kong con US\$ 849 millones (21.7% del total), Estados Unidos con US\$ 500 millones (12.8% del total), Turquía con US\$ 230 millones (5.87%), Grecia con US\$ 86.6 millones (2.21%) (agencia agraria de noticias, 2024).

En los últimos años, se ha creado y puesto a la venta diferentes sistemas de inmersión temporal con el objetivo de disminuir costos iniciales en equipos, así como ahorrar en espacio y mano de obra. Los sistemas de inmersión temporal se caracterizan por ser

práctico en su diseño, económicos y contar con piezas de plástico intercambiables. Además, son fáciles de utilizar, ocupan poco espacio, se pueden esterilizar en autoclave y son reutilizables (Etienne y Berthouly 2002).

Además, el sistema ha logrado incrementar la tasa de multiplicación y la supervivencia de las plantas durante las fases de aclimatación, con aumentos que varían entre 40% y 50% según el tipo y la cantidad de planta. Esto conlleva a la reducción de costos de producción de hasta un 50% en comparación con el sistema convencional.

Por ello, para obtener óptimos resultados en la multiplicación *in vitro* mediante Sistema de Inmersión Temporal hay que elegir el tipo de medio y optimizar las combinaciones de reguladores de crecimiento, el tiempo y frecuencia de inmersión.

Además, el SIT podría proporcionar una respuesta adecuada al elevado costo relacionado con la propagación a gran escala de portainjertos cerezo a través de las técnicas tradicionales de cultivo de tejidos.

II. MARCO TEORICO

2.1. Antecedentes

La micropropagación es una técnica del cultivo de tejidos vegetales (CTV), el cual aprovecha las capacidades de las células vegetales para obtener múltiples plantas, genéticamente iguales; llamadas clones, en un ambiente aséptico, dentro de contenedores cerrados, empleando medios de cultivo específicos y en condiciones controladas (Bello, 2019; Martínez, 2023).

Entre las ventajas de la micropropagación está; la producción rápida de cultivos con importancia agroalimentaria; sustituyendo las técnicas tradicionales de corte, injerto y división (Debnath et al., 2020), obtener clones de plantas recalcitrantes, propagar líneas parentales (programas de mejoramiento genético), permite el saneamiento de plantas que podrían tener enfermedades causadas por virus, bacterias y hongos (Martínez, 2023).

La micropropagación de especies leñosas, como es caso de *Prunus* sp, es compleja, ya que estos árboles se caracterizan por su tejido lignificado, lo que le brinda firmeza a la

pared celular y fortaleza ante la presencia de microorganismos, evitando la introducción de las enzimas que puedan destruir a la célula. Los árboles leñosos son de ciclo vegetativo y crecimiento muy largo (Díaz, 2019). Asimismo, Godoy (2017), menciona que los árboles frutales como el cerezo; ya sea variedad, portainjertos o híbridos, de interés en la industria frutícola, presentan una serie de dificultades para su propagación vegetativa. Para lograr una rápida producción masiva de plantas genéticamente iguales de *Prunus* sp; en un espacio reducido, en poco tiempo y con mínimos suministros, es ideal la micropropagación en sistemas de inmersión temporal.

Los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT); son herramientas muy favorables para la producción masiva de plantas *in vitro*. Estos sistemas consisten en biorreactores semiautomatizados o automatizados. En los SIT los explantes están en contacto con el medio líquido en periodos intermitentes; esto permite un mayor aprovechamiento de los nutrientes e intercambio gaseoso. Además, determinar el tiempo y frecuencia de inmersión, y el volumen de medio líquido para el cultivo que se desea micropropagar son factores claves para obtener una alta tasa de multiplicación y evitar la vitrificación. (Delfino, Rivata y Bima, 2020).

Para el híbrido *Garfinem* (*P. persica* x *P. amygdalus*) se desarrolló su sistema de inmersión temporal adaptable a varias condiciones de cultivo, volúmenes de medio, recipientes; en donde los brotes apicales y la frecuencia de inmersión de 6hr fueron los más adecuados. Las vitro plantas tenían mayor; tamaño, número de nudos, pigmentos fotosintéticos. Asimismo, la sobrevivencia en la aclimatación en ex vitro fue del 60% (Delfino *et al.*, 2020).

En la investigación realizada por Griffis *et al.*, (2023) demostró que usar el biorreactor Plantform (uno de los diseños de SIT) con 400 ml de medio líquido, en el cultivo de *Aronia melanocarpa*; la tasa de multiplicación fue de 11,9 brotes por ciclo en comparación a 6,6 brotes por ciclo en la micropropagación convencional (medio semisólido); en ambos el material de inicio fue de 40 brotes. El número de brotes también depende del genotipo del portainjerto (*Prunus*) y el tipo de medio, así lo demostró Godoy (2017) en donde obtuvo 79 brotes del portainjerto Colt y 59 brotes de la variedad ‘Van’ a partir de 32 segmentos nodales.

En el 2017, Godoy realizó ensayos en un sistema de inmersión temporal para la micropropagación masiva de 2 portainjertos y 2 variedades de cerezo, logrando identificar 2 medios de multiplicación para estos cultivos: I) sales de Driver-Kuniyuki Walnut (DKW) complementado con 0.4 mg/l de BAP, 0.01 mg/l de IBA, 500 mg/l de ác. Ascórbico, 25 gr/l de sacarosa, 500 mg/L mioinositol y pH 6 y el segundo medio II) sales DKW, con 0.8 mg/l de BAP, 0.01 mg/l de IBA, 500 mg/l de ác. Ascórbico, 25 gr/l de sacarosa, 500 mg/L mioinositol y pH 6. Su tiempo y frecuencia de inmersión más eficientes fueron de 3min por 3 veces al día.

Dentro de las investigaciones realizadas en especies leñosas está la que realizó Perugorria (2012); obteniendo mejores resultados en los RITA y BIT; para el portainjerto de manzano M9 la mayor cantidad y calidad de brotes, lo obtuvo usando el medio DKW suplementado con 4.4 µml de BAP y 0.5 µml de IBA en la etapa de multiplicación, con tiempo y frecuencia de inmersión de 1 min cada 8 hr. Mientras que para el eucalipto usó el medio WPM con 0.001 mg/l de BAP y 0.001 mg/l de ANA, con tiempo y frecuencia de inmersión de 1 min cada 3 hr.

Los flujos periódicos de aire estéril permiten un breve contacto de los explantes con el medio líquido, mientras se renueva la atmósfera del recipiente va generando un intercambio gaseoso de CO₂, aunque en algunos genotipos este efecto provoca un cierto grado de hiperhidricidad en los brotes; Nasri et al. (2019) realizó ensayos con explantes en diferentes tiempos de inmersión, donde mostró una baja tasa de propagación y un aumento de signos de hidratación y toxicidad a los explante; sumergidos cada 3 y 6 horas por 5 min de inmersión, sin embargo, el aumento significativo de brotes se dio cada 12 horas por 20 min de inmersión.

Dasilva et al. (2018) al proporcionar inmersión del medio de cultivo de 1 min cada 8 horas al día y 1 minuto de aireación con CO₂ enriquecido 16 veces al día a los biorreactores plantform™, las tres variedades de cereza (“Negra de San Cristobo”, “Negra de Fene” y “De Viño), proliferaron con éxito, pero el coeficiente de multiplicación y la longitud de los brotes se vieron afectados por el genotipo. En cambio, los estudios realizados por Delfino et al. (2022); argumenta que los brotes apicales y la frecuencia de inmersión cada 6 h, resultó la combinación más conveniente para la propagación *in vitro* del portainjerto

híbrido *Prunus persica* x *P. amygdalus*. Por otra parte, el tratamiento con frecuencia de inmersión de 12 horas obtuvo una mejor respuesta en contenidos de clorofila total, clorofila a y b, y carotenoides.

La investigación de Godoy et al. (2017) demostró que el número de inmersiones influyen en los parámetros productivos y como resultado, algunos genotipos no presentan hiperhidratación al colocar tres veces de inmersión por día con una duración de 3 min; y con 4 veces de inmersión por día con una duración de 1 minuto.

Además, Nasri et al. (2019) agregó que para el uso del SIT modelo RITA se empleó sales MS suplementado con 1 mg/L N6-benciladenina (BAP) y 1 mg/L ácido indol-3-butírico (IBA), que obtuvieron mayores niveles de pigmentos fotosintéticos en brotes cultivados en biorreactores, durante las etapas de proliferación y enraizamiento. Asimismo, Godoy et al. (2017) agrega que en los sistemas de inmersión temporal SIT también se hace uso del medio líquido DKW (base Driver Kuniyuki Walnut), suplementado con 0,01 mg/L ácido indol-3-butírico (IBA), 0.8 mg/L bencil-amino-purina (BAP), 500 mg/L ácido ascórbico y 500 mg/L mioinositol, 25 gr/L sacarosa y pH 6, los estudios fisiológicos mostraron que los brotes producidos por SIT de 14 días representaron una etapa intermedia entre las plantas adultas y las derivadas de sólidos, aunque las eficiencias fotosintéticas de estos materiales revelaron una falta de capacidad autotrófica en este punto.

También estudios realizados por Gago et al. (2022) el número y la calidad de los brotes se vieron influidos positivamente por las sales MS y la combinación de las hormonas 0.5 mg/L ácido indol-3-butírico (IBA) y 0.5 mg/L bencil-amino-purina (BAP), concentración de sacarosa en el medio, además de la luz y el ambiente gaseoso. De igual manera, en el cultivo de manzano empleando BIT (biorreactor de inmersión temporal) de frascos gemelos, Damiano et al. (2003) utilizó sales MS como medio basal con 0.05 mg/L ácido indol-3-butírico (IBA) y 0.4 mg/L bencil-amino-purina (BAP), donde se obtuvo una influencia positiva en los pigmentos fotosintéticos.

Los brotes generados por SIT son más vigorosos en comparación con los de producción convencional en medio semisólido. Se observan mayores niveles de pigmentos

fotosintéticos durante las etapas de multiplicación y enraizamiento, lo que demuestra cierto grado de fotoautotrofia de las vitroplantas derivadas de RITA (Nasri et al. 2019; Al-Shareefi, et al. 2020).

Martínez (2023), demostró que empleado el modelo de sistema de inmersión temporal; RITA, obtuvo las mayores concentraciones de clorofila total, en el cultivo de *H. undatus*, siendo el resultado de una mayor disponibilidad de nitrógeno y magnesio, los cuales son parte de la molécula de clorofila y cofactores como el cobre y hierro; los cuales son indispensables en la síntesis de clorofila.

En el trabajo de Llanos (2015) utilizó el SIT para micropropagar *Ananas comosus*, donde su medio de cultivo estaba compuesto por las sales y vitaminas del medio Murashigue Skoog suplementado con 100 mg/l de Myoinositol, 20 g/l de sacarosa, 2.1 mg/l de BAP y 0.3 mg/l de ANA, en donde obtuvo la mayor cantidad de brotes. Su frecuencia de inmersión fue de 3 min cada 3 horas, durante 6 meses, a una temperatura de 25°C, con fotoperiodo de 11/1; horas luz blanca (fluorescentes).

2.2.Marco conceptual

2.2.1. Origen del cerezo

El cerezo proveniente de Europa y Asia, llegó a América en los años 1600 con los primeros conquistadores que trasladaron el cerezo, sin embargo, la producción del frutal empezó a mediados de 1800 (Miranda y Fernández, 2015).

El cerezo común (*Prunus avium* L.) es un árbol que tiene una buena calidad de madera, por lo que es importante en el género *Prunus*. Su uso principalmente es para la producción de frutos, empleando como patrón para injertar otras variedades. (Loewe, Delard y Pineda, 2001).

2.2.2. Portainjertos

Los portainjertos con un similar genotipo de la variedad tienen un alto vigor, mientras que otras variedades tienen un bajo vigor al 40% menos de su capacidad en desarrollarse, este

resultado se debe a causas de la diferencia genética con la variedad productora y/o reducido el volumen radicular del portainjerto (Labra, Astudillo y Riquelme, 2005).

2.2.3. Características de algunos portainjertos disponibles en Perú

Colt es un cruce entre *P. avium* L. y *P. pseudocerasus*, este patrón es algo pequeño, y está más relacionado con una gran cantidad de variedades de cerezos, tiene un buen volumen radicular siendo profundo y extenso. Puede resistir a la asfixia radicular y al cáncer bacterial, también es capaz de resistir el estrés hídrico y a *Agrobacterium* spp (agallas de la corona), la distancia de plantación recomendada es de 5 m x 3 m (Canales, 2019).

Mahaleb tiene un sistema radicular semi profundo, requiriendo de un suelo con buen drenaje, ya que es apto de resistir la pudrición radicular y a *Verticillium* spp. Tiene rasgos que son resistentes al cáncer bacterial (Canales, 2019).

Gisela 6 es un portainjerto semi enanizante el cual tiene una buena resistencia al cáncer bacterial, incita una floración precoz, obteniendo como resultado una alta productividad, está acorde a los suelos arenosos, francos y arcillosos. Este patrón tiene la manera de ser tolerante a infecciones por virus (Canales, 2019).

2.2.4. Características de algunas variedades de interés comercial

Brooks, es originaria de Estados Unidos y el cruzamiento se dio a través de Rainier y Burlat, es un árbol vigoroso y tolerante a climas cálidos, el tamaño del fruto es grande y de forma arriñonada, su maduración es temprana y tiene excelente calibre con un buen sabor (Benegas et al., 2013).

Regina, es una variedad que fue seleccionada en Alemania en 1981 a partir del cruzamiento de ‘Schneiders y Rube’, Se considera una variedad autocompatible, y se recomienda utilizar polinizantes como la variedad kordia que es compatible, además se debe tomar en cuenta la zona geográfica y las condiciones agroclimáticas (Montecinos, 2021), sus frutos tienen un calibre de 27-29 mm, es de forma acorazonada y con buen sabor (Rodrigo, Macarulla y Escartín., 2016).

Santina, es variedad que se obtuvo por el cruce de stella y summit, es autofertil, por lo que no necesita que se plante con un polinizante, su fruto es grande de calibre de 28 mm y de agradable dulzor, además tiene un alto nivel de agrietado en la zona apical (Montecinos, 2021).

Lapins, es una variedad originaria de Canadá, se dio a través del cruzamiento de Van y Stella. El árbol tiene una productividad elevada que tiene la característica de producir en racimos, considerando una variedad autofértil que no requiere de polinizantes. Sus frutos tienen un gran peso (8 a 9 gramos), poseen una buena consistencia, sabor y resistencia media a partidura por lluvias. La variedad es de interés comercial por su elevado potencial productivo y su precocidad. (Ellena, 2003).

2.2.5. Propagación del cerezo

Inicialmente la propagación se hacía por injerto sobre el patrón, los patrones eran sembrados a partir de semilla y pasado los dos años se podían injertar con las yemas de la variedad deseada, el patrón tenía que estar bien establecido y en buenas condiciones en vivero para que se realice el injerto a fines de verano o empezando el otoño.

Actualmente se injertan sobre patrones clonales de cerezo y su forma más convencional para el injerto es de la yema en T o injerto de astilla.

Pero hace unos años se viene desarrollando la propagación de los portainjertos mediante la técnica *in vitro*, haciendo uso del sistema convencional (Riffaud, Cornu y Capelli, 1981; Cáceres, 2004).

2.2.6. Micropropagación *in vitro*

La micropropagación *in vitro* es utilizada para producir grandes cantidades de plantas asexual en un tiempo más corto, mediante un conjunto de técnicas y métodos de cultivo de tejidos. Además, se logran obtener plantas libres de enfermedades y virus (Ñahuinlla, 2018; Singh et al. 2010).

También con el uso de reguladores de crecimiento, como las auxinas, citoquininas y giberelinas permiten obtener plantas con cambios fisiológicos, genéticos y morfológicos; logrando resultados de interés en el área de biotecnología vegetal. (Perea, 2009). Además, la micropropagación *in vitro* se desarrolla bajo condiciones de ambientes estériles que controlan la temperatura, porcentaje de humedad y luz (Kunakhonnuruk, 2018).

2.2.7. Etapas de la micropropagación

La micropropagación *in vitro* agrupa cinco etapas que consisten en: selección de la especie, establecimiento del medio de cultivo, desarrollo del tejido, enraizamiento y aclimatación (Perea, 2009).

1. Selección de planta donante en vivero o campo
2. Establecimiento de explantes y adaptación en un medio artificial para inducción
3. Multiplicación, se inducen a la regeneración de explantes mediante formación de nuevas estructuras a través de la vía elegida (yemas axilar o adventicia, embriones, etc.)
4. Enraizamiento, se busca la formación de raíces con el fin de convertir en plántulas completas
5. Aclimatación, las plantas enraizadas son muy sensibles a los cambios ambientales, por lo que deben ser transferidas a condiciones externas con un proceso gradual (Martínez y Gago, 2008).

2.2.8. Medios de Cultivo

Los medios de cultivo son soluciones líquidas que ayudan en el desarrollo de microorganismos, células y tejidos vegetales o animales. Los componentes del medio de cultivo deben tener los nutrientes necesarios para el crecimiento de los tejidos "in vitro" y replicar las condiciones nutricionales del suelo natural. Los componentes principales incluyen macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, azúcares, agentes gelificantes y hormonas o reguladores de crecimiento (Sharry, Adema y Abedini, 2015).

Los medios de cultivo suministran nutrientes y energía para la síntesis de metabolitos y el mantenimiento celular de las plantas. Los laboratorios suelen utilizar los medios de cultivo para personalizarlos a las necesidades de cada cultivo, los requerimientos nutricionales varían según el metabolismo celular autotrófico y heterotrófico.

Tabla 1:

Componentes presentes en los medios de cultivo

COMPUESTOS DEL MEDIOS DE CULTIVO			
	C. Orgánicos	C. Inorgánicos	Otros
Agua	Carbohidratos	Macronutrientes	Carbón activado
	Vitaminas	Micronutriente	Agentes gelificante
	Reguladores de crecimiento		Caseína hidrolizada
	Antibióticos		

Nota: Elaboración propia a partir Sharry, Adema y Abedini. (2015). La composición del medio de cultivo es un factor crítico para el éxito del cultivo *in vitro*, ya que cada componente cumple una función específica en la nutrición, crecimiento y diferenciación de los tejidos vegetales.

- a. **Agua:** El agua destilada representa el 95% del medio de cultivo.
- b. **Fuente de carbono:** La sacarosa se usa comúnmente como fuente de carbono para satisfacer las necesidades de los explantes que no son totalmente autótrofos y no pueden cubrirlas mediante la fotosíntesis *in vitro* (Segretín, 2020), la sacarosa puede

ser sustituida por glucosa o fructosa (Roca y Mroginski, 1991), mientras que otros azúcares como maltosa, celobiosa y rafinosa se usan en tejidos específicos (Sharry, Adema y Abedini, 2015).

La adición de myoinositol al medio de cultivo a menudo mejora el crecimiento de callos y suspensiones celulares (Roca y Mroginski, 1991) y el manitol puede agregarse al medio de cultivo como nutriente o para regular la osmolaridad del sistema (Sharry, Adema y Abedini, 2015).

- c. **Vitaminas:** las plantas son capaces de sintetizar sus propias vitaminas, pero en ocasiones es necesario agregar algunas de ellas al medio de cultivo, especialmente durante el crecimiento inicial o cuando los cultivos aún no han alcanzado la etapa de madurez (Segretín, 2020). Por lo que complejos vitamínicos desempeñan un papel crucial en el crecimiento y la diferenciación de las plantas al catalizar el metabolismo celular (Sharry, Adema y Abedini, 2015).

En muchos medios de cultivo, la tiamina, la piridoxina y el ácido nicotínico se añaden de manera regular por conveniencia. Se ha observado que las raíces fragmentadas no pueden sintetizar tiamina y requieren de sus añadidos en cultivos continuos (Segretín, 2020).

La Tiamina (Vitamina B1), es esencial para las células ya que participa en la oxidación del ácido pirúvico en el ciclo respiratorio. Las plantas sintetizan tiamina en las hojas y la almacenan en los cotiledones de las semillas. A pesar de descomponerse durante la esterilización por autoclave, la mayoría de los tejidos pueden sintetizarse a partir de los productos resultantes. Se encuentra en concentraciones elevadas en la naturaleza, especialmente en los cereales, y se utiliza en medios de cultivo en concentraciones cercanas a 0,4 mg/L. (Sharry, Adema y Abedini, 2015).

Piridoxina (vitamina B6), es termo y fotoestable. Aunque no es esencial en el cultivo de tejidos, juega un papel fundamental en la síntesis de ácidos nucleicos y promueve el crecimiento vegetal al participar en procesos energéticos (Sharry, Adema y Abedini, 2015).

Ácido nicotínico (vitamina B3), estimula el crecimiento de las plantas al formar parte de coenzimas implicadas en reacciones energéticas, siendo resistente a la luz y al calor, y se añade generalmente al medio de cultivo en concentraciones de 0,1 a 10 mg/L (Sharry, Adema y Abedini, 2015).

Otras vitaminas como el ácido pantoténico, biotina y riboflavina pueden ser útiles, pero no son absolutamente necesarias (Roca y Mroginski, 1991).

Ácido pantoténico (vitamina B5), es termoestable y puede ser esterilizado junto con el medio de cultivo, siendo parte de la coenzima A y desempeñando un papel en el metabolismo de las grasas. Aunque no es esencial, se agrega al medio en forma de pantotenato de calcio (Sharry, Adema y Abedini, 2015).

La Biotina (vitamina H) no es esencial, pero tiene un papel importante en el crecimiento de levaduras y algunas bacterias. Además, desempeña una función crucial en el metabolismo de grasas, proteínas y carbohidratos (Sharry, Adema y Abedini, 2015).

Riboflavina (vitamina B2). Desempeña un papel importante en el metabolismo de los carbohidratos y en la respiración celular. A diferencia de otras vitaminas, la riboflavina es resistente al calor, pero sensible a la luz (Sharry, Adema y Abedini, 2015).

El ácido ascórbico se considera beneficioso en algunos casos debido a su capacidad para actuar como agente reductor y retrasar la formación de sustancias que inhiben el crecimiento.

Sin embargo, es importante tener en cuenta la termolabilidad de estos suplementos y tomar precauciones adecuadas para mantener la esterilidad al agregarlos al medio enfriado.

d. Reguladores de crecimiento- fitohormonas (PGR)

La fitohormonas o reguladores de crecimiento han incrementado su uso recientemente, por ser una herramienta importante en el control del crecimiento y actividad bioquímica de las plantas (Alcántara et.al., 2019), al lograr efectos específicos en los órganos (Gaspar et al., 1996). Además, son más potentes y su correcta aplicación depende de la dosis, sensibilidad de la planta y condiciones. No contienen nutrientes y generalmente no son tóxicos para las plantas (Rademacher, 2015).

Existen diferentes tipos de reguladores de crecimiento, como auxinas, citoquininas, giberelinas y sustancias que retardan o inhiben el crecimiento. Estos pueden ser hormonas naturales o reguladores de crecimiento sintético (Sharry et.al., 2015).

Las auxinas estimulan el alargamiento celular y la formación de callos y raíces adventicias, pero inhiben la formación de brotes axilares adventicios y, ocasionalmente, la embriogénesis. Las citoquininas promueven la división celular y regulan el crecimiento y desarrollo de tejidos vegetales (Segretín, 2020).

Las giberelinas en determinadas circunstancias están en el proceso del cultivo de meristemas o en el crecimiento de brotes (Levitus et al., 2010). El ácido abscísico (ABA), una hormona vegetal que protege a las plantas del estrés abiótico mediante el cierre de estomas y la mejora de la resistencia al frío. También inhibe la germinación temprana de las semillas (Rademacher, 2015).

El etileno exógeno como regulador del crecimiento presenta dificultades debido a su naturaleza gaseosa. Sin embargo, se han desarrollado productos químicos que liberan etileno de manera controlada, como el 'etefón' utilizado como regulador del crecimiento en cultivos de tejidos (George, Hall y Klerk, 2008).

Tabla 2:*Ejemplos de PGR utilizados en cultivo in vitro de plantas*

Clase de Reguladores	Abreviatura o nombre común	Nombre químico
Auxinas	AIA	Ác. 3-indolacético
	ANA	Ác. Naftalenoacético
	AIB	Ác. Indolbutírico
	ApCFA	Ác.(4- clorofenoxil) acético
	2,4D	Ác. 2,4-diclorofenoxiacético
	Picloran	Ác. 4-amíno-3,5,6-tricloropico-linico
	ANOA	Ác. naftoxiacético
Citoquininas	Kinetina (KIN)	6-furfurilaminopurina
	BAP (BA)	6-benzilaminopurina. 6-benziladenina
	2IP	Isopentiladenina
	Zeatina (ZEA)	N-(4-hidroxi-3-metilbut-2-enil)aminopurina
	PBA	(6-benzilamino)-9-2-tetrahidropiranil-9H-purina
	Tidiazuron (TDZ)	1-fenol-3(1,2,3-tidiazol-5il)urea
Giberelinas	Ac. Giberelico (GA ₃)	2,4a,7-trihidroxi-1-metil-8-metilen-gib-3-ene-1,10-acidocarboxílico-1,4-lactona
Inhibidores	ABA	Acido abscísico
Etileno	Etileno	C ₂ H ₄
	Ethephon, Ethrel	Acido 2-cloroetilfosfónico

Nota: Elaborado a partir de Fuente Sharry et al. (2015). Los reguladores de crecimiento vegetal controlan procesos clave en el cultivo in vitro, como la formación de brotes, raíces y la diferenciación celular. Su tipo y concentración varían según el explante y la etapa del cultivo.

Interacción de auxinas y citoquininas: La interacción entre la auxina y la citoquinina es esencial para regular el comportamiento celular y la división en las plantas. Estas hormonas influyen en el desarrollo y crecimiento de brotes, controlando diferentes etapas del ciclo celular. Las auxinas dispersan las células en cultivos, mientras que las citoquininas las agrupan. Sin embargo, aún se desconoce completamente cómo funcionan a nivel molecular y cómo interactúan en la expansión, división y diferenciación celular. A pesar de numerosas investigaciones, los mecanismos precisos de estas hormonas y su interacción siguen siendo un área de estudio en curso. (George et al., 2008).

- e. Antibióticos:** El uso de antibióticos en el cultivo de tejidos vegetales desinfecta los explantes, pero su uso es excepcional y en cultivos cortos debido a su especificidad limitada para prevenir todos los microorganismos (Roca y Mroginski, 1991). Por lo tanto; Sumergir los explantes en soluciones con antibióticos y/o antimicóticos

(gentamicina, estreptomina, ampicilina, tetraciclina, carbenicilina, pentacloronitrobenzoceno, rifampicina, anfotericina B, benomil, carbendazim) es útil. Sin embargo, estos productos alteran el medio de cultivo y pueden ser metabolizados por los explantes, lo cual debe tenerse en cuenta al usarlos (Abreu et al. 2016).

- f. Macronutrientes y micronutrientes:** Componentes inorgánicos: Los tejidos y órganos de las plantas se cultivan *in vitro* en medios artificiales, que proporcionan los nutrientes necesarios para su desarrollo. En los macroelementos se usan grandes cantidades de: iones de nitrógeno (N), potasio (K), calcio (Ca), fósforo (P), magnesio (Mg) y azufre (S), y pequeñas cantidades de microelementos: hierro (Fe), níquel (Ni), cloro (Cl), manganeso (Mn), zinc (Zn), boro (B), cobre (Cu) y molibdeno (Mo). Las sales de micronutrientes y macronutrientes pueden ser consideradas esenciales para el crecimiento de las plantas si cumple con los siguientes criterios (Boeri, 2015):

1. Es necesario para que la planta complete su ciclo de vida.
2. Su acción es específica y no puede ser completamente reemplazada por ningún otro elemento.
3. Su efecto se produce directamente en el organismo de la planta y no indirectamente en el medio ambiente.
4. Es un componente de una molécula que se sabe que es esencial.

Otras sales como carbono (C), oxígeno (O) e hidrógeno (H) son elementos básicos y otros como el cobalto (Co), aluminio (Al), sodio (Na) y yodo (I), son básicos o beneficiosos para algunas plantas.

- g. Absorción de nutrientes inorgánicos:** Las plantas absorben nutrientes inorgánicos del suelo en forma de iones, que pueden ser cargas positivas (cationes) o negativas (aniones). Estos nutrientes se encuentran en forma de sales y son absorbidos por las células vegetales, especialmente en las raíces. Ejemplos de cationes absorbidos son el Ca^{2+} , Mg^{2+} y K^{+} .

En el cultivo de tejidos, la absorción de nutrientes suele ser proporcional a la concentración del medio de cultivo, pero esto puede variar para elementos específicos.

Por ejemplo, un estudio encontró que el aumento de la concentración del medio no resultó en un incremento significativo en la absorción de zinc, lo que indica que la concentración existente era suficiente. Esto sugiere que la captación de nutrientes es selectiva y posiblemente activa. En toda la planta, los nutrientes se absorben pasivamente o mediante mecanismos activos que implican el gasto de energía (George y Klerk, 2007).

La absorción activa suele ser menos dependiente de la concentración iónica que la pasiva. Ambos sistemas son afectados por la presencia de otros elementos, pH, temperatura y estado de los tejidos. Estos factores pueden ser controlados por la solución en las raíces o influir en el equilibrio iónico ideal. Por ejemplo, el magnesio compite con otros cationes, lo que puede resultar en deficiencia cuando hay altas concentraciones de potasio o calcio, y viceversa (George y Klerk, 2007).

Hay evidencia de que el amonio se utiliza más fácilmente que el nitrato vegetal a bajas temperaturas, y su absorción puede mejorar los niveles de carbohidratos en las células. La absorción de calcio no es eficiente y las concentraciones en los tejidos vegetales suelen reflejar las del suelo.

Las plantas tienen poca sensibilidad a los iones de sulfato, pero altas concentraciones de fosfato pueden inhibir el crecimiento de elementos menores como el zinc, hierro y cobre. Aunque la absorción de nutrientes en el cultivo de tejidos puede ser similar, no es probable que sea idéntica en términos de bioquímica y fisiología (George y Klerk, 2007).

In vivo, en el entorno natural, las plantas absorben iones minerales a través de sus raíces. No se han realizado estudios exhaustivos sobre cómo ocurre la absorción de nutrientes en cultivos de brotes. Para el IAA, se ha demostrado que la mayoría se absorbe a través de la superficie de corte y solo una pequeña parte a través de la epidermis. Lo mismo puede aplicarse a los minerales. Sin embargo, es importante destacar que, en el cultivo de tejidos, las estomas están abiertos en la parte expuesta al aire, así como en los tejidos en contacto con un medio semisólido o líquido, lo que sugiere una posible absorción a través de los estomas.

Una vez absorbido, el transporte dentro de la planta se produce en el flujo de masa a través del xilema. En las plantas in vivo hay dos mecanismos para impulsar el flujo de agua, la presión radicular y el gradiente de potencial hídrico entre el suelo y la atmósfera. En condiciones normales, este último es el más importante, porque el flujo de agua resultante de la presión radicular es en sí mismo suficiente para el suministro de minerales a larga distancia. Las plantas sin raíces a menudo se cultivan *in vitro*, donde la atmósfera es muy húmeda, por el flujo impulsado por la diferencia del potencial hídrico. A pesar de ello, el cultivo de tejido parece haber suficiente flujo de agua, que puede verse favorecido que los estomas están continuamente abiertos. No hay indicios de que la estructura del xilema se vea alterada de tal forma para reducir el transporte de iones (George y Klerk, 2007).

Cuando los explantes se colocan por primera vez en un medio nutrientes, puede haber una fuga inicial de iones de las células dañadas, especialmente cationes metálicos (Na^+ , Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+}) durante los primeros 1-2 días, de modo que la concentración en los tejidos de la planta disminuye. Las células comienzan entonces la absorción activa y la concentración interna aumenta lentamente.

El fosfato y el nitrógeno (sobre todo el amonio) se absorben más rápidamente que otros iones. En medio líquido, casi todo el fósforo y el amonio se absorben en las dos primeras semanas de cultivo. Tras la captación, el fósforo se redistribuye masivamente a los tejidos que se forman tras las dos primeras semanas (George y Klerk, 2007).

2.2.9. Biorreactores

Los biorreactores son contenedores de vidrio o plástico (color claro o transparentes) estériles que emplean sistemas de entrada y salida de medios nutritivos líquidos y/o aire; permitiendo un mejor control de la temperatura, aireación, agitación, el pH y el oxígeno disuelto (Murthy et al., 2023). Uno de sus grandes aportes en el cultivo in vitro es la multiplicación masiva de plantas de alta calidad, reduciendo los costos de mano de obra

(Watt, 2012; Godoy et al., 2017). Además, se obtiene mayor tasa de supervivencia en la etapa de aclimatación (Fundación para la Innovación Agraria, 2009).

En un inicio los biorreactores se emplearon para el cultivo de microorganismos, producción de metabolitos secundarios a partir de la suspensión de células vegetales y posteriormente para la micropropagación de plantas. Existen diversos tipos de biorreactores que difieren por el tipo de contenedor y el sistema que proporciona la agitación del cultivo; no agitado, mecánico o neumático. Entre los principales tipos de biorreactores, se tienen los sistemas de inmersión continua y sistemas de inmersión temporal (Vidal y Sánchez, 2019).

2.2.10. Tipos de Biorreactores

a. Sistemas de Inmersión Continua (SIC):

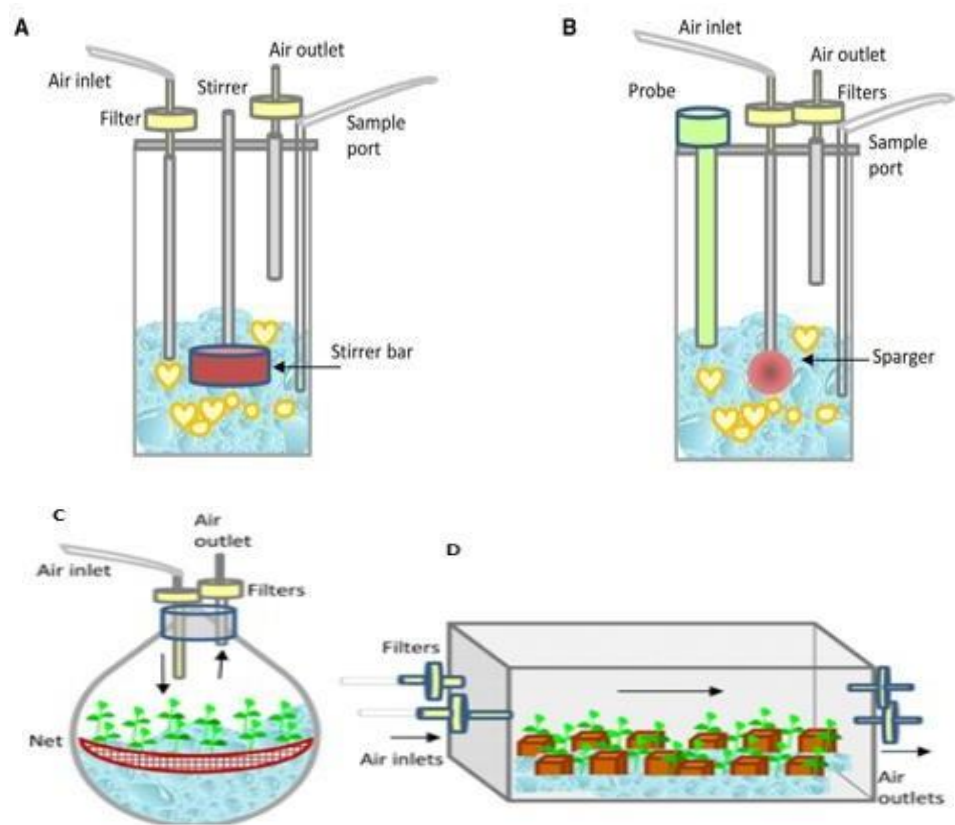
En los biorreactores de SIC, el medio líquido está de forma permanente en contacto con el explante, lo cual puede provocar hiperhidricidad y/o malformaciones; ya que en el medio líquido no hay la cantidad suficiente de oxígeno para abastecer las necesidades respiratorias de los tejidos sumergidos. La falta de oxígeno en células vegetativas provoca estrés oxidativo causando daños en el tejido vegetal. Para evitarlo, se debe administrar oxígeno mediante agitación y/o aireación, o exponiendo al explante o parte de este al aire. A continuación, se mencionan algunos modelos de biorreactores de SIC (Vidal y Sánchez, 2019; Georgiev et al. 2014).

- **Tanque agitado:** consta de un agitador mecánico y con diferentes entradas para la aireación, adición o eliminación del medio. La principal desventaja es el cizallamiento.
- **Airlift:** es un biorreactor neumático que a través de un difusor inyecta aire filtrado desde la base inferior del contenedor; logrando así la aireación y la mezcla del medio. También generan daños por cizallamiento debido a la aireación, pero en menor intensidad que el tanque agitado.
- **Biorreactor globo:** Tiene filtros y puede tener algún soporte en donde solo una porción de los explantes estará en contacto con el medio líquido.

- **Biorreactor con soporte poroso:** Cuenta con filtros para el intercambio gaseoso y con un material permeable como soporte en donde se colocan los explantes; evitando sumergir por completo las plantas en el medio líquido.

Figura 1:

Modelos de biorreactores de inmersión continua



Nota: Modelos de biorreactores: A) Tanque agitado, B) Airlift, C) Biorreactor globo, D) Biorreactor con soporte poroso. Vidal y Sánchez (2019).

b. Sistemas de Inmersión Temporal (SIT)

Los sistemas de inmersión temporal o también llamados biorreactores de inmersión temporal, han sido diseñados para cultivos intermitentes semi automatizados o automatizados; los tejidos vegetales o explantes son sumergidos en el medio líquido por un determinado tiempo, luego los explantes son retirados del medio líquido y expuestos a un ambiente con intercambio gaseoso estéril; esto se repite según el tipo de especie vegetal que se está cultivando. Todo el proceso se desarrolla bajo condiciones de asepsia y parámetros ambientales controlados. Los resultados óptimos en estos sistemas dependen del tiempo y frecuencia de inmersión. Los SIT pueden estar conformados por un contenedor con compartimentos o dos envases separados (Castillo et al. 2019; Muñiz, 2018).

El uso de biorreactores en la micropropagación vegetal permite una mayor productividad masiva, además disminuye los costos generados por la mano de obra y aumenta la efectividad del cultivo *in vitro* (Iglesias, 2018). En la actualidad hay diversos diseños de SIT que se utilizan en la micropropagación masiva de especies vegetales, entre los principales tenemos:

- **Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado (RITA):** Es uno de los primeros modelos de SIT diseñados, el cual consta de un solo contenedor con 2 divisiones; separados por una bandeja de plástico. En la parte superior, sobre un soporte (malla de plástico) se colocan los explantes y en el nivel inferior se encuentra el medio de cultivo líquido. La fase de inmersión se logra con la inyección de aire estéril generada por una bomba de aire que permite el ascenso del medio de cultivo y así los explantes queden en contacto con el mismo. Una vez que cesa el flujo de aire, las presiones se equilibran y el medio retorna por gravedad a la parte inferior del recipiente. Además, se logra un adecuado intercambio gaseoso por los filtros instalados en la parte superior del contenedor (Muñiz, 2018).

Figura 2:

Bioreactor RITA



Nota: El biorreactor RITA® (Recipient for Automated Temporary Immersion) es un sistema de inmersión temporal que permite alternar fases de aireación e inmersión del explante en medio líquido. Favorece una mayor proliferación de brotes, reduce la vitrificación y mejora la eficiencia del cultivo in vitro en comparación con medios semisólidos. Tomado de Othmani et al. (2011)

- **Sistemas de frascos gemelos (Twin-Flask system):** En este sistema los recipientes del medio de cultivo y el de los explantes están separados y el flujo del medio de cultivo líquido es a través de un conducto (generalmente de silicona) en forma de U; este une a ambos envases. La circulación del medio líquido depende de un timer y una compresora de aire.

El medio es impulsado por el aire comprimido en uno de los envases y transferido al otro contenedor, quedando los explantes en el medio líquido por un determinado tiempo, hasta que nuevamente se inyecta el aire comprimido y el medio regresa a su frasco inicial. El flujo de aire se da a través de filtros 0,22 μm (Muñiz, 2018).

Figura 3:

Sistema tipo Twin Flask



Nota: El sistema Twin Flask es un biorreactor artesanal de inmersión temporal que alterna medio líquido y aireación. Mejora la calidad del cultivo in vitro y reduce la vitrificación. Tomado de Alvarenga y Salazar (2015)

- **PLANT FORM:** Este biorreactor consiste en un recipiente de policarbonato transparente autoclavable con un soporte tipo canastilla con agujeros pequeños que sostiene el material vegetal. Un marco con cuatro patas se coloca sobre la canastilla para evitar que la canastilla suba cuando se aplica presión de aire al biorreactor. Además, para el intercambio gaseoso tiene 3 entradas/salidas ubicadas en un extremo mediante tuercas y abrazaderas en los agujeros del recipiente y aseguradas con anillos de silicona. El flujo de aire se da a través de filtros estériles unidos a tubos de silicona a las entradas.

Uno de los filtros (el del medio) está ensamblado a una manguera de plástico al interior del biorreactor y pasa a través de la canastilla. El ensamblado y ubicación de la canastilla permite que las plantas solo tengan contacto con el medio líquido cuando se aplica presión de aire al biorreactor.

- **SETIS:** Consta de 2 envases horizontales unidos uno sobre otro, cada envase tiene una abertura con empaques de silicona y tapas de rosca, están conectados el uno al otro mediante una manguera de silicona en la parte inferior del contenedor. A través de un agujero con un filtro, en los extremos superiores, permite el intercambio gaseoso.

Figura 4:

Modelos comerciales de SIT



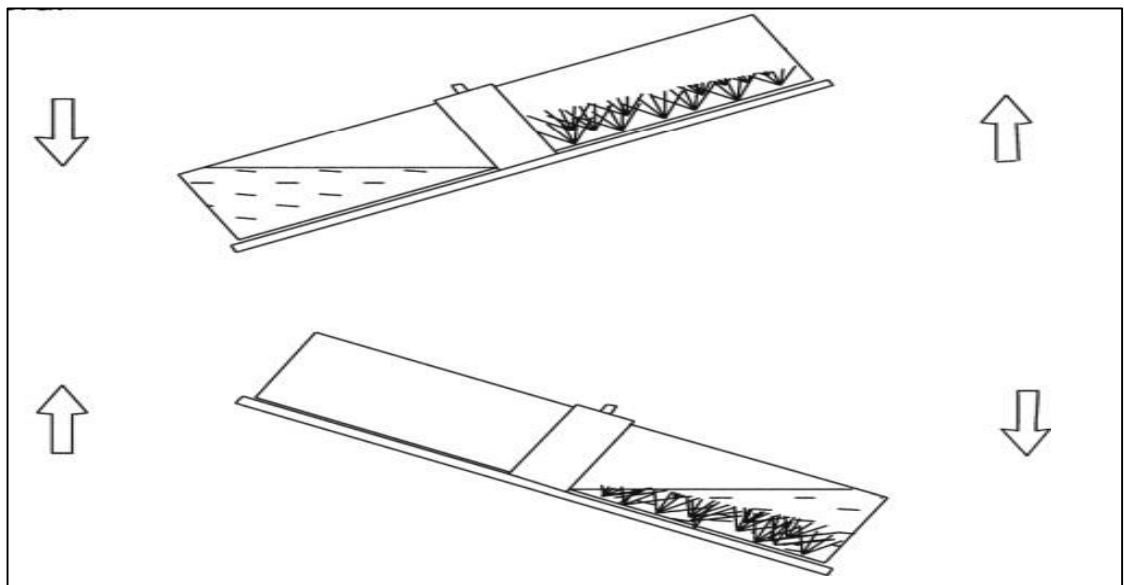
Nota: Son sistemas comerciales de inmersión temporal (SIT) diseñados para la micropropagación a escala industrial. Ambos permiten mayor automatización, reducen costos de producción y mejoran la calidad y uniformidad de las plántulas in vitro. A) PLANTFORM® B) SETIS®

- **Biorreactor Modular de Inmersión Temporal (BioMint):** En este tipo de biorreactor, la gravedad permite la circulación del medio líquido de un recipiente al otro, cuenta con 2 envases cilíndricos (uno para los explantes y otro para el medio de cultivo), cerrados por un extremo y unidos entre sí por una pieza rosca (con conexiones para filtros para la aireación) que a la vez tiene una placa perforada que permite la circulación del medio cuando los biorreactores cambian de posición.

Es autoclavable y su estructura simple permite abrirlo y cerrarlo de forma práctica en la introducción y retiro de las vitroplantas, además de facilitar el cambio de medio de cultivo líquido (Robert, et al., 2006).

Figura 5:

Biorreactor modular de inmersión temporal (BioMINT)



Nota: BioMINT es un biorreactor modular de inmersión temporal diseñado para mejorar la eficiencia en la micropropagación. Su estructura flexible y reutilizable permite una mejor aireación, automatización del cultivo y reducción de la vitrificación, figura tomada de Robert et al. (2006).

III. METODOLOGÍA

3.1. Lugar donde se ejecutó el proyecto

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología Vegetal– Biotec, en la Empresa CAMPOSOL S.A., Chao, La Libertad.

3.2. Enfoque de la investigación

Por su propósito: Aplicada

Por su naturaleza: Experimental

3.3. Operacionalización de variables

En el anexo 6 se indica la operacionalización de las variables independientes y variable dependiente.

3.4. Población

El banco de germoplasma estaba conformado por 10000 plantas *in vitro* de *Prunus* sp.

3.5. Muestra

La muestra fue de 1530 brotes de *Prunus* sp; los cuales se emplearon en los tratamientos en biorreactores PLANTFORM

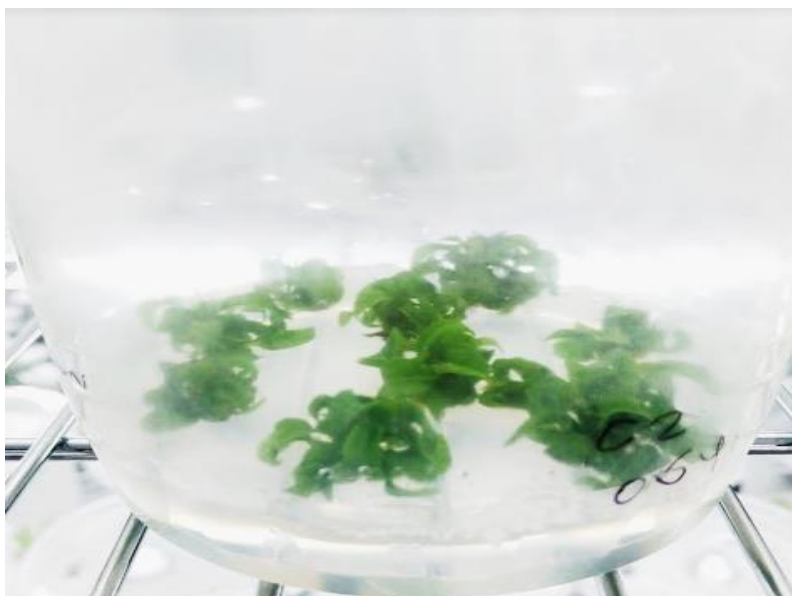
3.6. Material vegetal

Se utilizó brotes *in vitro* del portainjerto comercial de cerezo (*Prunus* sp) y se comparó la micropropagación en medio semisólido y la micropropagación en medio líquido empleando biorreactores de sistemas de inmersión temporal.

El material vegetal del portainjerto comercial cerezo (*Prunus* sp) se obtuvo del Banco de germoplasma, del laboratorio de Biotecnología vegetal-Camposol S.A.

Figura 6:

Brotes de Cerezo del Banco de Germoplasma – Camposol S.A



Nota: Los brotes de cerezo forman parte del banco de germoplasma del laboratorio de Biotecnología Vegetal de Camposol S.A., conservados *in vitro* para asegurar la disponibilidad de material genético de alta calidad, contribuir a la preservación de la biodiversidad y respaldar programas de propagación y mejora genética.

3.7. Preparación y siembra del material vegetal *in vitro* en medio semisólido

En un vaso de precipitado se preparó 100 ml de medio de multiplicación, se utilizó el medio basal DKW (Driver Kuniyuki Walnut) que fue suplementado con IBA y BAP (ANEXO 1). Con HCL o NaOH 0.5 N se ajustó el pH a 6.

Una vez preparado, esterilizado a una temperatura de 121°C a 15lb, durante 20 min. (Ramos, 2012), se dispensó en 3 frascos de vidrio aprox. 33 ml en cada frasco. El medio se dejó incubar por 3 días, luego se realizó la siembra; 4 brotes de 1 a 1.5 cm con yemas activas, los explantes estuvieron 25 días en este medio, donde se regeneraron nuevos brotes (Aguilera, 2020). Los explantes se colocaron en una cámara acondicionada para su desarrollo y crecimiento; con un fotoperiodo de 16:8 (luz/oscuridad), temperatura de 23°C $\pm$ 2°C, lámparas fluorescentes de luz blanca de una intensidad de 2000 Lux, Humedad Relativa del 60%. Contando con total esterilidad (Ramos, 2012).

Figura 7:

Siembra en Medio Semisólido



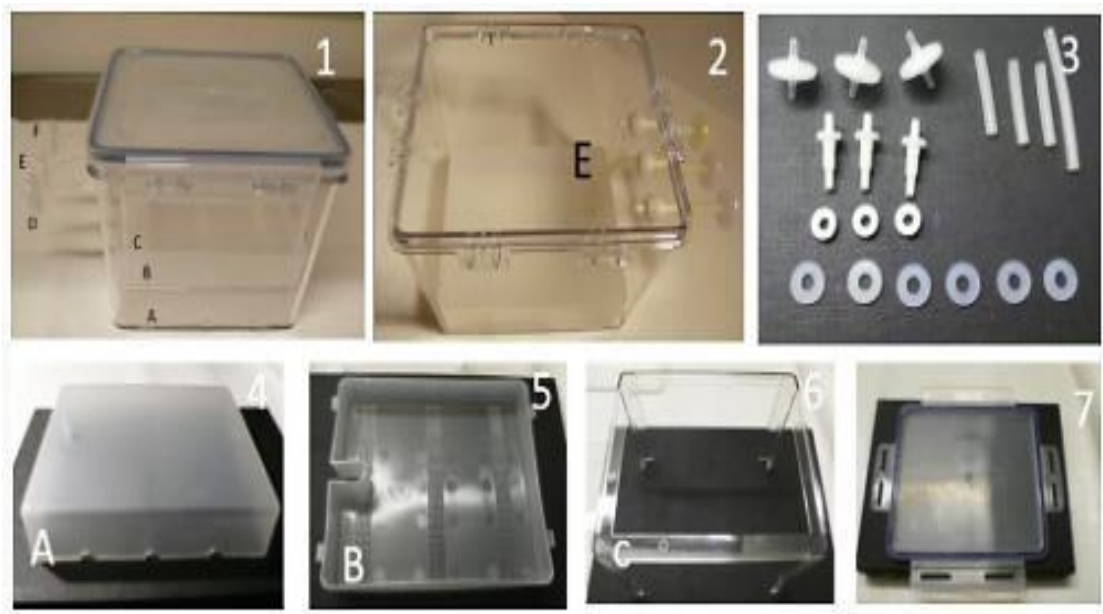
Nota: La siembra se realizó en medio semisólido con el objetivo de evaluar el establecimiento inicial de los explantes bajo condiciones controladas

3.8. Acondicionamiento y esterilización de los biorreactores PLANT FORM

Cada uno de los biorreactores estuvieron conectados a 3 tubos de plástico, abrazaderas, tuercas, y anillos de silicona que conectó con la entrada y salida, lo cual permitió el intercambio gaseoso. Se conectó el filtro central a un tubo de plástico de la cámara interior del biorreactor, se colocó la canasta y el marco de cuatro patas en la parte interior. El biorreactor se cerró; en la tapa no se ejerció presión, ya que se colocaron en la autoclave. en los biorreactores a 121 °C durante 20 min a una presión de 15 lb.

Figura 8:

Piezas del Biorreactor PLANT FORM



Nota: 1) 3 entradas/salidas para intercambio de gases, 2) muestra el filtro central conectado a un tubo de plástico en la cámara interior, 3) filtros, tubos de plástico, tuercas, abrazaderas y anillos de silicona, 4) cámara

Figura 9

Esterilización de los biorreactores PLANTFORM



Nota: Los biorreactores PLANTFORM® son esterilizados por autoclave a alta temperatura (121 °C, 15 psi), garantizando condiciones asépticas para el cultivo in vitro y evitando contaminaciones durante el proceso de inmersión temporal

3.9. Preparación del medio líquido

Se preparó el medio de cultivo según tratamiento, a cada biorreactor se agregó 400 ml de medio líquido suplementado con sales de DKW, azúcar 30 gr/L, ppm 1m/L y diferentes concentraciones de IBA y BAP (Anexo 2), el pH se ajustó a 6. El medio se esterilizó a 121°C a 15lb, durante 20 min. Luego se llevó a una cabina de flujo laminar y se dispensó en cada biorreactor. Cabe, recalcar que para el **testigo** se tomó como referencia las concentraciones de fitohormonas, el tiempo y frecuencia de inmersión empleadas por Godoy et al., (2017), Anexo 2.

Figura 10

Preparación de medio líquido



Nota: La preparación del medio líquido se realiza disolviendo los nutrientes, reguladores de crecimiento y azúcares en agua destilada, ajustando el pH y esterilizando por autoclave para asegurar condiciones asépticas en el cultivo in vitro

Figura 11

Dispensado del medio en los biorreactores PLANTFORM



Nota: El medio líquido esterilizado se dispensa asépticamente en los biorreactores PLANTFORM®, asegurando el volumen adecuado para la inmersión temporal de los explantes.

3.10. Siembra en los biorreactores PLANT FORM

Se utilizó 30 brotes (3 brotes por clúster) de 1.5 cm, por cada PLANT FORM (sistema de inmersión). A los 25 días de cultivo se procedió a evaluar la tasa de multiplicación, la longitud de brotes, el área foliar y la concentración de clorofila (clorofila a y b).

Figura 12

Siembra en PLANTFORM



Nota: Descripción del proceso de siembra; 1) Brotes para sembrar en medio de multiplicación, 2) siembra en biorreactores, 3) Explantes sembrados en medio de multiplicación en biorreactor.

3.11. Instalación del sistema de inmersión temporal – Biorreactores PLANT FORM

Al terminar la siembra en cada biorreactor PLANT FORM, se procedió a ubicarlos en un estante cromado, se conectaron las mangueras a las bombas de aire; estas se activaron de acuerdo con lo programado en el timer. Se estableció un fotoperiodo de 16:8 (luz/oscuridad), temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, lámparas fluorescentes de luz blanca de una intensidad de 2000 Lux, Humedad Relativa del 60%.

Figura 13

Instalación de los biorreactores plantform



Nota: La instalación de los biorreactores PLANTFORM® se realiza en condiciones estériles, conectándolos a un sistema de aireación y temporizador para controlar los ciclos de inmersión y asegurar un funcionamiento eficiente.

3.12. Evaluación de cada tratamiento

Se monitoreó cada tratamiento para que sean estables los tiempos y frecuencias de inmersión según los parámetros de cada unidad experimental. A los 25 días se procedió a evaluar cada una de las variables dependientes: Tasa de multiplicación, longitud de tallos, concentración de clorofila y área foliar.

3.13. Diseño experimental

En este proyecto se empleó un diseño experimental factorial 2^4 con 4 variables independientes (Concentración de IBA, concentración de BAP, Tiempo y la frecuencia de inmersión) con dos niveles, empleando un sistema de inmersión temporal (biorreactor Plantform). Además, se evaluaron 4 variables dependientes (tasa de multiplicación, longitud de tallo, área foliar y concentración de clorofila); con el objetivo de lograr la micropropagación masiva de *Prunus* sp. En total se establecieron un total de 16 tratamientos (Fernández, 2020, Montgomery, 2004); con 3 réplicas cada uno, más el testigo (Tabla 5), sumando un total de 51 tratamientos. El testigo fue la misma formulación del medio semisólido, pero sin el agente gelificante (ANEXO 02). En cada tratamiento se utilizó como material de partida 30 brotes; siendo un total de 1530 brotes.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con los resultados obtenidos, con una probabilidad de error de 0.05%, también se realizó una prueba de rango TUKEY para definir las diferencias significativas entre los tratamientos, empleando el software PYTHON versión 11.

Tabla 3:

Definición de las variables y niveles de estudio.

FACTORES – VARIABLES INDEPENDIENTES				
NIVELES	Concentraciones	Concentraciones	Tiempo de	Frecuencia de
	de IBA (A)	de BAP (B)	Inmersión (C)	inmersión (D)
Alto (+)	0.5 mg/L	1 mg/L	6 min	24 horas
Bajo (-)	0.1 mg/L	0.5 mg/L	4 min	12 horas

Nota: Se evaluaron cuatro factores independientes en dos niveles (alto y bajo): concentración de IBA, concentración de BAP, tiempo y frecuencia de inmersión. Estos parámetros se seleccionaron por su influencia directa en la respuesta morfogénica del cultivo in vitro.

Tabla 4:*Matriz de experimentos de diseño factorial*

TRATAMIENTOS	FACTORES			
	A	B	C	D
T ₁	-	-	-	-
T ₂	+	-	-	-
T ₃	-	+	-	-
T ₄	+	+	-	-
T ₅	-	-	+	-
T ₆	+	-	+	-
T ₇	-	+	+	-
T ₈	+	+	+	-
T ₉	-	-	-	+
T ₁₀	+	-	-	+
T ₁₁	-	+	-	+
T ₁₂	+	+	-	+
T ₁₃	-	-	+	+
T ₁₄	+	-	+	+

T₁₅	-	+	+	+
T₁₆	+	+	+	+

Nota: a matriz experimental corresponde a un diseño factorial completo 2^4 , que evalúa la combinación de cuatro factores (A, B, C y D) en dos niveles cada uno (alto y bajo). Se aplicaron 16 tratamientos para analizar el efecto individual y combinado de los factores sobre la respuesta del cultivo

Tabla 5:*Tratamientos y variables independientes (matriz de experimentos).*

TRATAMIENTO	VARIABLES INDEPENDIENTES			
	A	B	C	D
	IBA (mg/L)	BAP (mg/L)	Tiempo de inmersión (min)	Frecuencia de inmersión (hrs)
T1	0.1	0.5	4	12
T2	0.5	0.5	4	12
T3	0.1	1	4	12
T4	0.5	1	4	12
T5	0.1	0.5	6	12
T6	0.5	0.5	6	12
T7	0.1	1	6	12
T8	0.5	1	6	12
T9	0.1	0.5	4	24
T10	0.5	0.5	4	24
T11	0.1	1	4	24
T12	0.5	1	4	24
T13	0.1	0.5	6	24
T14	0.5	0.5	6	24
T15	0.1	1	6	24
T16	0.5	1	6	24

Nota: Los 16 tratamientos del diseño factorial 2⁴, donde se combinan distintas concentraciones de IBA y BAP, junto con variaciones en el tiempo y frecuencia de inmersión. Estos factores fueron seleccionados por su influencia en la respuesta morfogénica en condiciones de cultivo in vitro.

3.10. Variables dependientes:

3.10.1. Tasa de multiplicación de brotes (T_m)

Se determinó la tasa de multiplicación de brotes a partir del conteo de brotes generados por cada explante en los distintos tratamientos evaluados (medio semisólido y líquido). Después de un periodo de 25 días, se registró el número total de brotes desarrollados por cada explante.

La tasa de multiplicación se calculó utilizando la siguiente formula:

$$T_m = \frac{N^{\circ} \text{ de brotes finales} - N^{\circ} \text{ de brotes iniciales}}{\text{Tiempo}}$$

Este valor permitió comparar la eficiencia de cada tratamiento en la generación de brotes, identificando las condiciones óptimas para maximizar la propagación in vitro. Los datos fueron expresados como promedio $\pm$ desviación estándar, y analizados estadísticamente para determinar diferencias significativas entre tratamientos

3.10.2. longitud de brotes (L_b)

Para la medición de la longitud de brotes, se realizó una evaluación al finalizar la etapa de multiplicación de cada uno de los tratamientos, se seleccionaron plantas regeneradas tras un periodo de 25 días. Se midió la longitud de brote principal de cada explante utilizando una regla, tomando como referencia el punto de inserción del brote en la base del explante hasta el ápice. Las mediciones se realizaron con precaución para evitar dañar el tejido vegetal.

Se tomo como mínimo 3 repeticiones por tratamiento, Los datos obtenidos se registraron en una hoja de cálculo para su posterior análisis estadístico.

La variable fue expresada en centímetros (cm) y se utilizó como uno de los indicadores de eficiencia del sistema de inmersión temporal en comparación con el sistema de cultivo convencional

3.10.3. Área foliar (Af)

El área foliar de los brotes obtenidos se estimó al término del periodo de evaluación, tomando como referencia hojas completamente desarrolladas de cada tratamiento. Para ello, se midió el largo (L) desde la base del peciolo hasta el ápice de la lámina foliar y el ancho (A) en la parte más ancha de la hoja, utilizando una regla milimétrica.

La estimación del área foliar (Af) se realizó aplicando la fórmula empírica propuesta por (Cittadini y Peri, 2006), la cual incluye un factor de corrección de 0.7 para especies frutales de hojas simples:

$$A_f = 0.7 * \text{Largo} * \text{Ancho}$$

Donde.

Af= Area foliar (cm²)

Largo= Longitud de la hoja (cm)

Ancho= Ancho de la hoja (cm)

0.7= factor de corrección empírico para *Prunus* sp.

Esta metodología permitió obtener un valor representativo del área foliar sin necesidad de equipos de digitalización o escáner, manteniendo precisión aceptable para fines comparativos entre tratamientos.

3.10.4. Concentración de clorofila (Cc)

- **Colecta de hojas frescas:** se recolectó el tejido de hojas frescas de la parte superior de la plántula, se obtuvieron 3 muestras de 1500 a 2000 mg por cada tratamiento.
- **Recepción y acondicionamiento de muestras de hojas:** Las muestras se recibieron de diferentes tratamientos en sobres de papel aluminio y a una temperatura aproximadamente de 8° C. Estas fueron procesadas inmediatamente después de su recepción.
- **Extracción de pigmentos:** Las muestras fueron acondicionadas para su procesamiento, se retiró el peciolo de cada hoja y fueron homogenizadas con Acetona 80% (v/v) usando un homogenizador Ultraturrax T25, para facilitar la extracción se agregó carbonato cálcico. El homogenizado es extraído con ayuda de un rotador de tubos Thermo Scientific y posteriormente, fue separado mediante centrifugación. Se realizó dos extracciones más a partir del pellet recuperado y se completó el volumen final hasta 25 ml con acetona 80% (v/v). Para proteger las muestras de la luz, los tubos se envolvieron en papel aluminio. El extracto recuperado fue centrifugado antes de medir absorbancias para eliminar posible turbidez. La lectura para clorofilas se realizó inmediatamente después de su extracción. Cada muestra fue procesada por triplicado y, además, se determinó el

porcentaje (%) de humedad de estas, para corregir los datos obtenidos en masa fresca

- **Determinación colorimétrica de clorofilas de hojas de cerezo:** La lectura para clorofilas se realizó a razón de las longitudes de onda indicadas en los métodos de Porra (2002) y Lichtenthaler (1987). Para la medida de la absorbancia en las clorofilas la lectura se realizó a 663.6 y 646.6 nm. También se realizó la medida de la absorbancia a 750 nm para eliminar así los posibles problemas de turbidez de las muestras.

Adicional a la evaluación de las variables dependientes, se realizó una evaluación morfológica, según las características que se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 6:

Evaluación morfológica

CALIFICACIÓN	DESCRIPCIÓN
1	Fuertemente vitrificado, necrótico y malformado
2	Menos vitrificado, necrótico y malformado
3	poco vigor
4	vigor medio
5	excelente vigor

Nota: La evaluación morfológica se realizó mediante una escala de calificación del 1 al 5, considerando el grado de vitrificación, necrosis, malformación y vigor de los brotes regenerados. Esta escala permitió clasificar de forma objetiva la calidad de la respuesta *in vitro*.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de la tasa de multiplicación de los explantes de *Prunus* sp de cada tratamiento:

Una vez transcurrido 25 días de los explantes en los distintos tratamientos en biorreactores plantform se procedió a recopilar la data según se detalla en la Tabla 7. Cabe indicar que, adicional a los tratamientos en biorreactores plantform, se realizó un cultivo en medio semisólido (Tc) el cual tenía la misma concentración de hormonas del testigo en medio líquido (T0).

Tabla 7:

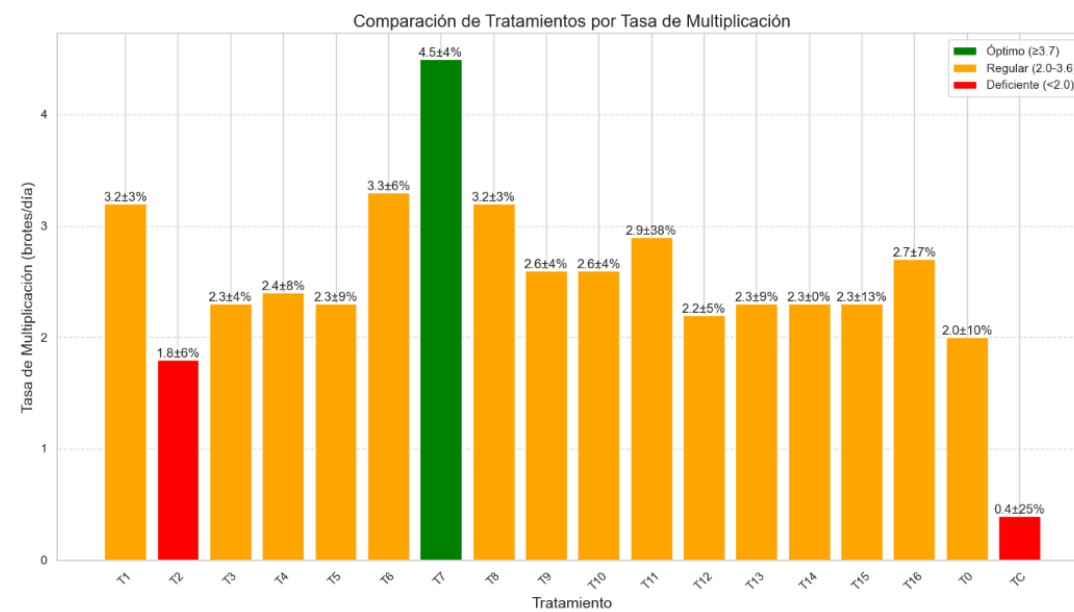
*Evaluación de la tasa de multiplicación de los explantes de *Prunus* sp.*

Tasa de multiplicación (brotes/día)				
Tratamiento	N° explantes inicial	N° explantes final	media	desviación estándar
TC	30	40.3	0.4	0.1
T0	30	81	2	0.2
T1	30	110	3.2	0.1
T2	30	75.3	1.8	0.1
T3	30	87	2.3	0.1
T4	30	90.3	2.4	0.2
T5	30	86.6	2.3	0.2
T6	30	112.6	3.3	0.2
T7	30	142	4.5	0.2
T8	30	110	3.2	0.1
T9	30	94.3	2.6	0.1
T10	30	94.3	2.6	0.1
T11	30	101.6	2.9	1.1
T12	30	84.6	2.2	0.1
T13	30	86.3	2.3	0.2
T14	30	87.3	2.3	0
T15	30	86.3	2.3	0.3
T16	30	98.3	2.7	0.2

Nota. En la Tabla 7 muestra que la mayor tasa de multiplicación lo obtuvo el T7, seguido del T6, el T1 y T8 obtuvieron la misma tasa de multiplicación.

Figura 14

Comparación de tratamientos de la tasa de multiplicación



Nota. En la figura 14, se puede visualizar que el tratamiento T7 tiene el mayor número de brotes (4.5) y una escasa variabilidad (4%).

Tabla 8:

ANOVA de los tratamientos para evaluar la tasa de multiplicación.

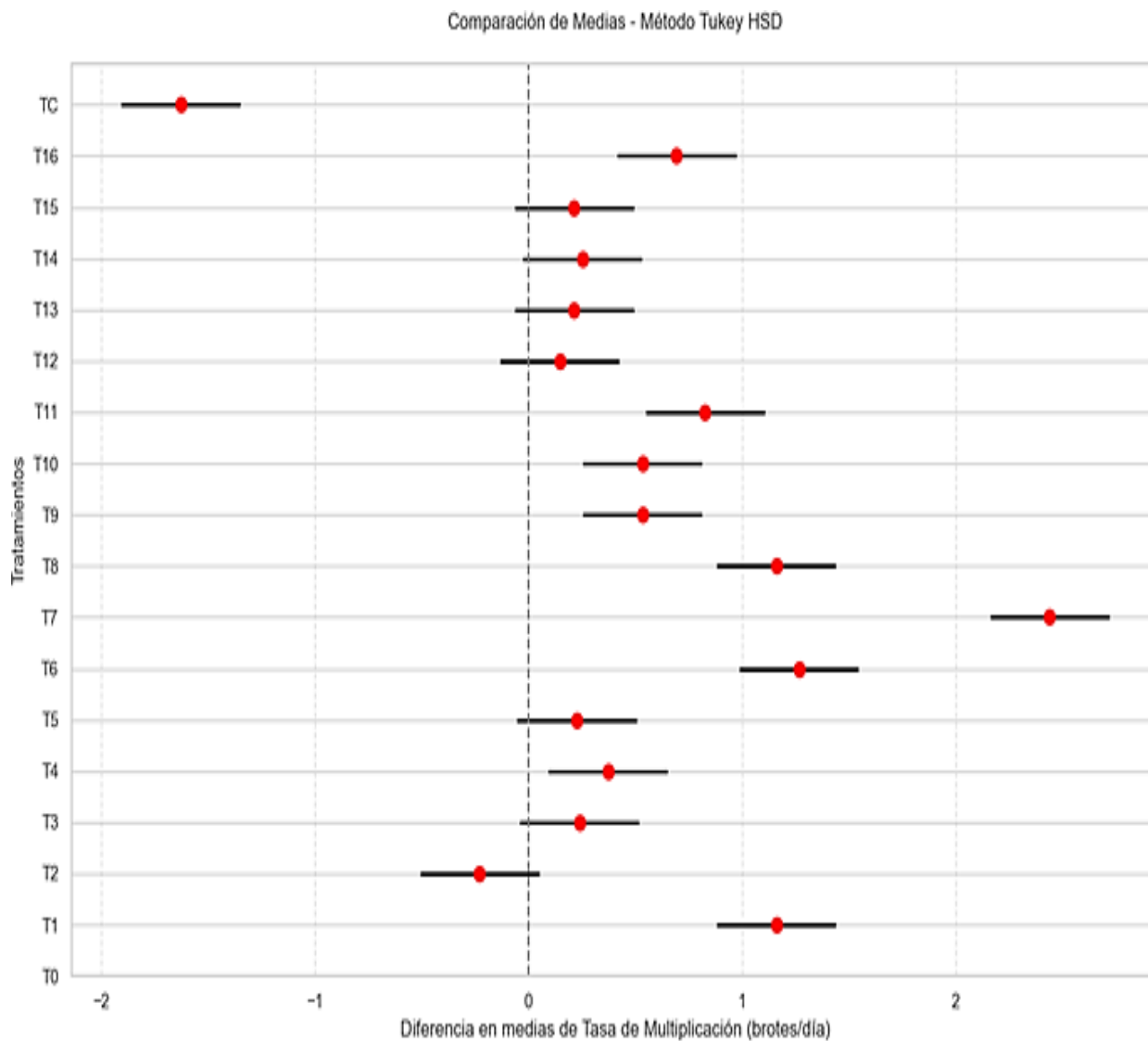
	suma de cuadrados	grados de libertad	estadístico F	PR(>F)
Tratamiento	334.904853	17	207.598379	2.07E-219
Residual	49.535787	522		

Nota. El análisis de varianza (ANOVA) que se muestra en la Tabla 8, indica que las diferencias entre los tratamientos son significativamente mayores que la variabilidad dentro de cada tratamiento, lo que se refleja en la suma de cuadrados y el valor del estadístico F.

Según el análisis de varianza, los tratamientos tienen un impacto estadísticamente significativo en la tasa de multiplicación, es decir, que los tratamientos aplicados efectivamente influyen en la variable de respuesta.

Figura 15

Comparación de medias - método Tukey HSD



Nota: La figura 15 muestra la prueba de comparación de medias en Tukey, en el cual el T7 tuvo una mayor tasa de multiplicación, siendo así significativamente diferenciado de los demás tratamientos.

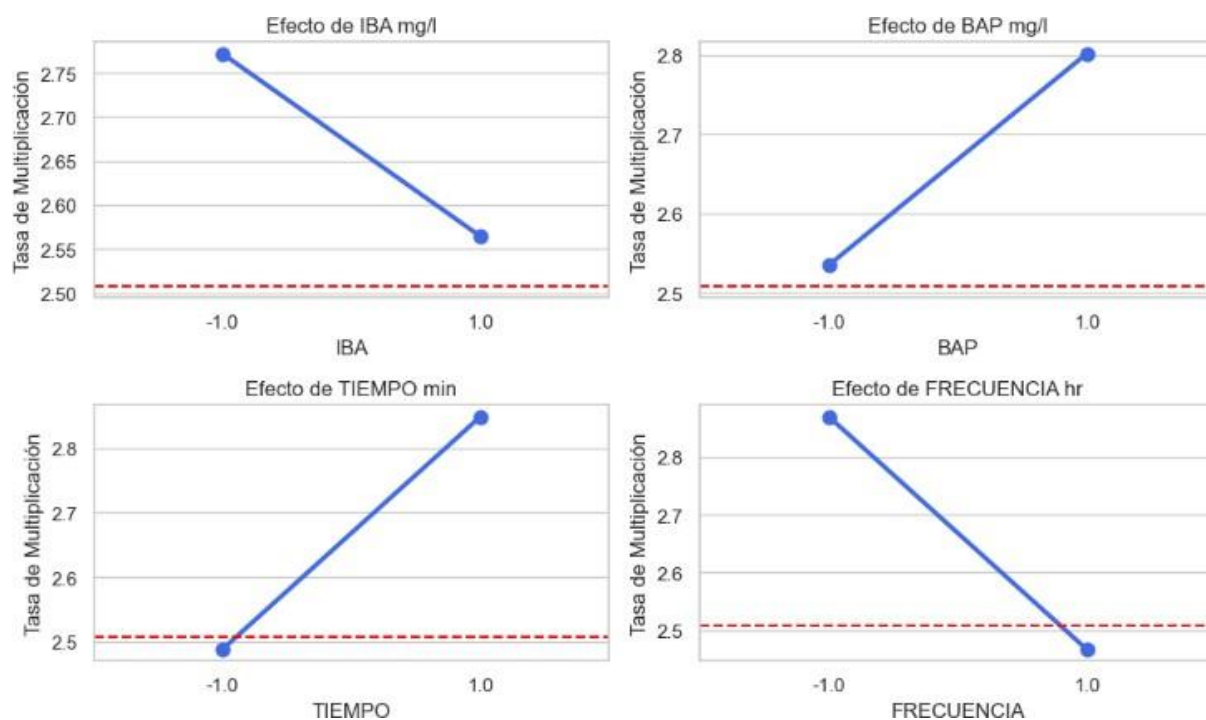
Tabla 9*ANOVA del diseño factorial de 4 variables independientes*

Análisis factorial de 4 variables independientes				
Variables	suma de cuadrados	df	F	PR(>F)
IBA: BAP: TIEMPO: FRECUENCIA	46.177613	1	444.410413	1.08E-69
TIEMPO: FRECUENCIA	33.32748	1	320.741548	6.56E-05
FRECUENCIA	19.48908	1	187.561666	4.28E-36
BAP: TIEMPO	16.398413	1	157.817287	2.32E-31
TIEMPO	15.580813	1	149.948756	4.54E-30
IBA: BAP: TIEMPO	13.899213	1	133.765145	2.33E-27
IBA: TIEMPO	9.20748	1	88.612202	2.25E-19
BAP	8.55468	1	82.329696	3.29E-18
BAP: TIEMPO: FRECUENCIA	6.702413	1	64.5036	8.01E-15
IBA	5.14188	1	49.485126	7.21E-12
BAP: FRECUENCIA	3.902413	1	37.556578	1.90E-09
IBA: FRECUENCIA	3.34668	1	32.208235	2.44E-08
IBA: BAP	2.017613	1	19.417382	1.31E-05
IBA: BAP: FRECUENCIA	0.582413	1	5.605109	1.83E-02

Nota: El análisis factorial de cuatro variables independientes evaluadas en la Tabla 9 sobre la tasa de multiplicación de *Prunus* sp. Mostró que la variable independiente más influyente fue la frecuencia de inmersión, la cual obtuvo los valores más altos en la diferencia de cuadrados y el valor P. Pero la mayor significancia estadística la obtuvo la combinación de las 4 variables independientes, siendo así el T7 la combinación sugerida.

Figura 16

Representa la combinación sugerida T7.



Nota: En la figura 16, se muestra que el tratamiento que obtuvo la mayor tasa de multiplicación fue el T7: 0.1 mg/l IBA, 1 mg/l BAP, 6 min de inmersión y frecuencia de 12 h.

El tratamiento T7 generó la mayor la tasa de multiplicación, con 4.5 brotes en comparación con el T0 (testigo) que obtuvo 2 brotes, pero este último obtuvo mayor tasa de multiplicación frente al Tc (medio semisólido) que obtuvo 0.4 brotes; ambos tenían la misma concentración de hormonas; 0.01 mg/l IBA y 0.8 mg/l BAP, esto comprueba que emplear biorreactores plantform es más eficiente que el cultivo semisólido (Karakoyun *et al.* 2023).

En la investigación realizada por Griffis *et al.*, (2023) también demostró que empleando el biorreactor Plantform, en el cultivo de *Aronia melanocarpa*; la tasa de multiplicación

fue de 11,9 brotes por ciclo en comparación a 6,6 brotes por ciclo en la micropropagación convencional (medio semisólido); en ambos el material de inicio fue de 40 brotes. Así también, Godoy (2017) empleó biorreactores de inmersión temporal con los portainjertos de cerezo: Maxma-14 y Colt y las variedades Van y Rainer; para ello empleó como material de inicio segmentos internodales, obteniendo mejores resultados en número de brotes en los SIT; DKW como medio basal. Por otro lado, el trabajo realizado por Delfino *et al.* (2020) en donde emplea un SIT para la propagación *in vitro* de una especie leñosa como es el portainjerto híbrido *Garfinem* (*P. persica* x *P. amygdalus*), la mejor tasa de multiplicación (2.2 brotes) la obtuvo al utilizar brotes apicales como material de inicio, el tiempo y frecuencia de inmersión fue de 1 min cada 6 h y como medio basal utilizó WPM modificado, sacarosa 30 gr/l, suplementado con IBA 0.01 mg/l y BA 1 mg/l. Sin embargo, en este proyecto realizado la mejor tasa de multiplicación se obtuvo con brotes basales (clúster) como material de inicio, los explantes se sumergieron durante 6 minutos cada 12 h y el medio basal DKW fue suplementado con IBA 0.1 mg/l y BAP 1 mg/l. Esto confirma que la regeneración de nuevos brotes depende del genotipo del portainjerto (*Prunus*) y la formulación del medio de cultivo (Godoy, 2017).

Evaluación de la longitud de tallo de los explantes de *Prunus* sp de cada tratamiento:

Se evaluaron 16 tratamientos y se compararon con los resultados del tratamiento convencional (TC) y el tratamiento 0 (T0) para evaluar la longitud de tallos de plántulas *in vitro* en un SIT.

Tabla 10:

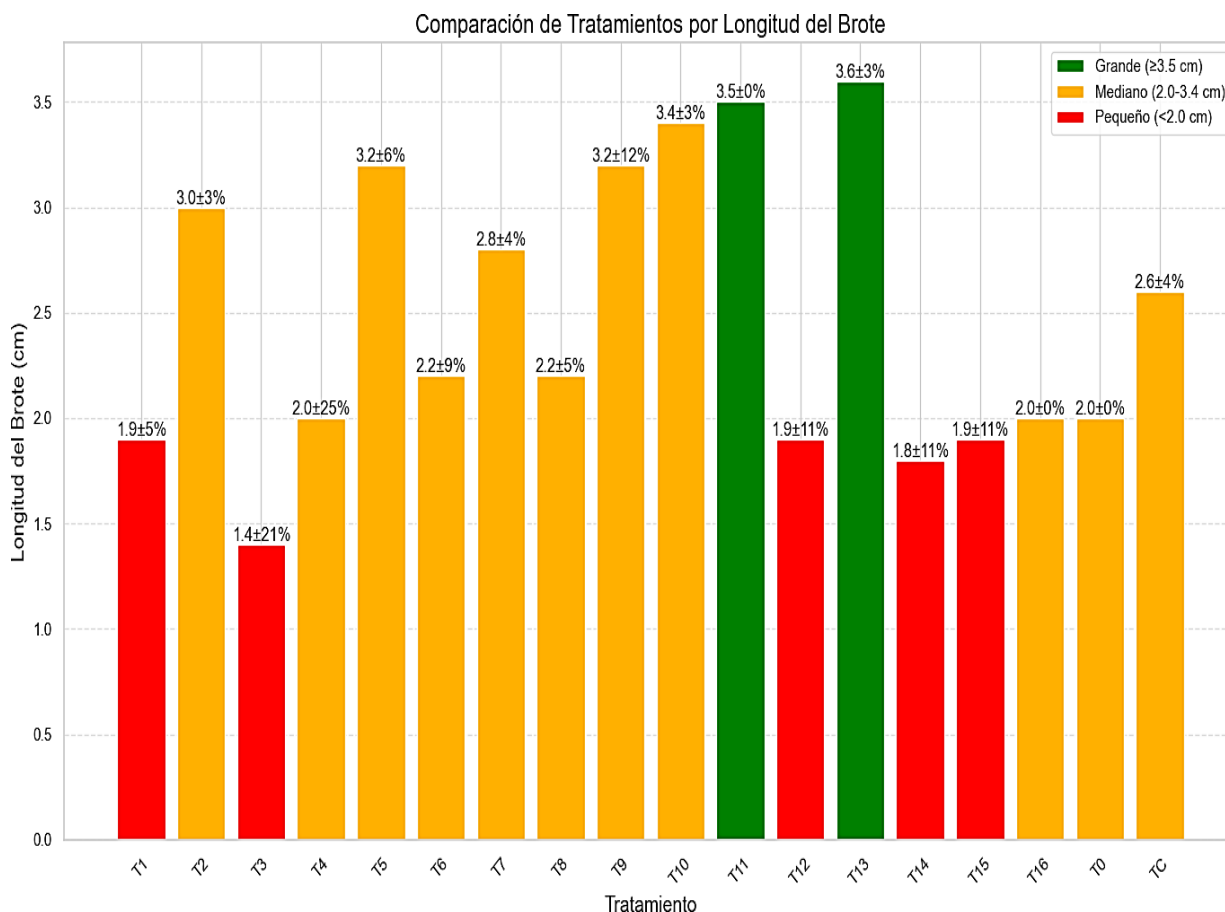
Evaluación de la longitud de tallos de los explantes en cada tratamiento

Longitud de tallos (cm)			
Tratamiento	N° explantes	media	desviación estándar
TC	30	2.6	0.1
T0	30	2	0
T1	30	1.9	0.1
T2	30	3	0.1
T3	30	1.4	0.3
T4	30	2	0.5
T5	30	3.2	0.2
T6	30	2.2	0.2
T7	30	2.8	0.1
T8	30	2.2	0.1
T9	30	3.2	0.4
T10	30	3.4	0.1
T11	30	3.5	0
T12	30	1.9	0.2
T13	30	3.6	0.1
T14	30	1.8	0.2
T15	30	1.9	0.2
T16	30	2	0

Nota: Top 5 de los mejores Tratamientos para Longitud de Brote: T13, T11, T10, T5, T9

Figura 17:

Comparación de tratamientos de longitud de tallos



Nota: visualización de Tratamientos, donde indica que el tratamiento T13 tiene la mayor

longitud de tallo 3.6 cm

En el Análisis de varianza (Tabla 12): Se observa que la diferencia entre tratamientos es mayor a la variación dentro de cada tratamiento en la suma de cuadrados y el estadístico F. Además, los tratamientos sí tienen un efecto estadísticamente significativo en la longitud de brote. T10, T11 y T13 están conectados por una barra, significa que no hay diferencias estadísticas entre ellos, aunque numéricamente $T13 > T11 > T10$.

Tabla 11:

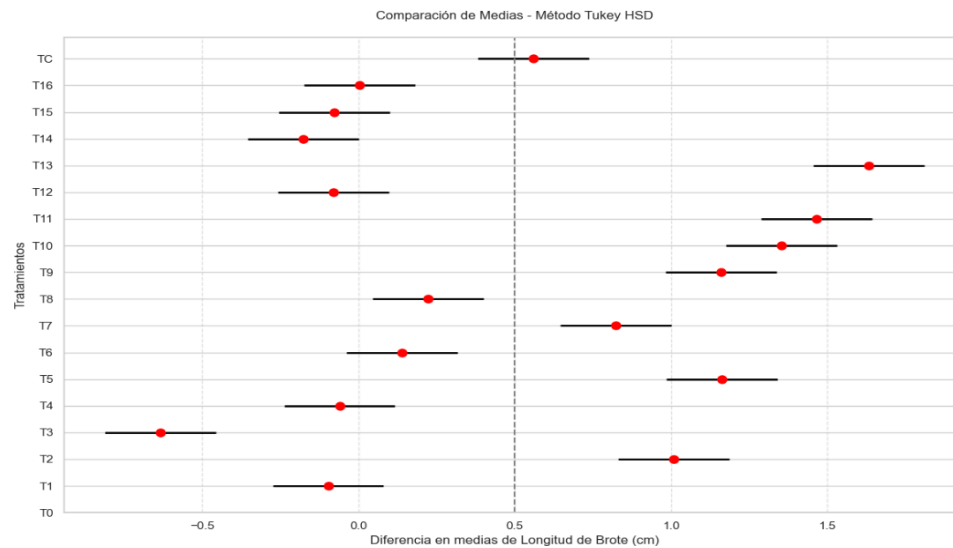
ANOVA de los tratamientos para evaluar longitud de tallos

	suma de cuadrados	grados de libertad	estadístico F	PR(>F)
Tratamiento	238.63251	17	367.539804	1.97E-277
Residual	19.936403	522		

Nota: El análisis ANOVA mostró diferencias altamente significativas entre tratamientos ($p < 0.001$) en la longitud de tallos, indicando un efecto claro de las variables evaluadas sobre esta característica morfológica

Figura 18:

Comparación de medias – Método de Tukey HSD



Nota: La prueba de comparación de medias en Tukey mostró que los tratamientos T13, T11 y T10 obtuvieron plantas más elongadas, superando incluso al TC.

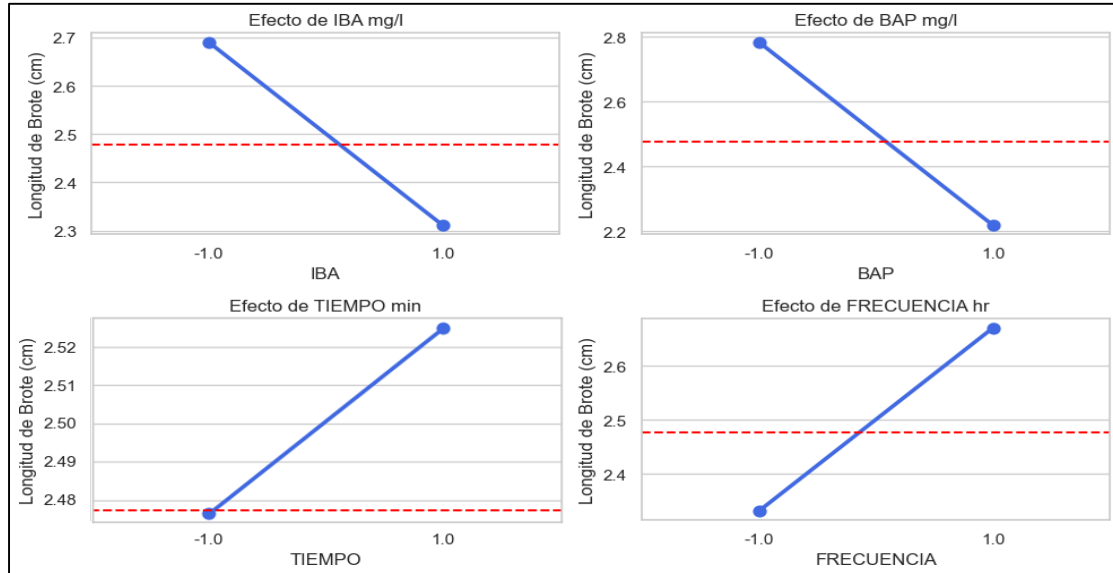
Tabla 12:*ANOVA del diseño factorial de 4 variables independientes para evaluar longitud de tallos*

Análisis factorial de 4 variables independientes				
Variables	suma de cuadrados	df	F	PR(>F)
TIEMPO: FRECUENCIA	40.50151	1	965.094057	2.05E-115
IBA: BAP: TIEMPO	39.428135	1	939.51704	1.36E-113
BAP	38.290052	1	912.398114	1.26E-111
IBA: TIEMPO	25.378202	1	604.726878	4.23E-86
IBA: FRECUENCIA	18.474977	1	440.23273	3.15E-69
IBA	17.187685	1	409.558379	9.65E-66
IBA: TIEMPO: FRECUENCIA	16.04911	1	382.427737	1.48E-62
FRECUENCIA	13.81426	1	329.174403	5.45E-56
IBA: BAP: TIEMPO: FRECUENCIA	13.41011	1	319.544076	9.36E-55
BAP: TIEMPO: FRECUENCIA	5.75751	1	137.193375	6.12E-28
BAP: TIEMPO	1.676785	1	39.955435	6.11E-10
BAP: FRECUENCIA	1.18306	1	28.190662	1.71E-07
TIEMPO	0.278885	1	6.645442	1.02E-02

El análisis factorial de cuatro variables independientes evaluadas Tabla 12 sobre la longitud de brotes de *Prunus* sp, mostró que la interacción entre el tiempo de inmersión y frecuencia presentó mayor significancia estadística, este resultado indica que la longitud de brotes no está determinada únicamente por un factor aislado, sino que corresponde de manera más efectiva a combinaciones específicas de las condiciones físicas del cultivo.

Figura 19:

Representación de la combinación sugerida T13



Nota: BAP representa la variable independiente más influyente por los valores más altos en la diferencia de cuadrados y el valor P. La combinación de Tiempo y Frecuencia explica la gran parte de variabilidad de los resultados.

Se evidenció que las inmersiones de corta duración, pero aplicadas con mayor frecuencia favorecieron a la elongación de los explantes, posiblemente debido a una mejor oxigenación y suministro de nutrientes, mientras se evita la saturación hídrica que puede derivarse por hiperhidricidad, un problema común en biorreactores de inmersión temporal (Berthouly y Etienne, 2005).

El análisis comparativo entre los tratamientos, el T13 a pesar de registrar mayor media de longitud de brote (3.6 cm), presentaron plantas con signos de hiperhidricidad (Anexo 3), este fenómeno es caracterizado por tejidos traslucidos y frágiles, limitando el uso práctico de este tratamiento,

ya que afecta la calidad fisiológica y la capacidad de supervivencia en etapas posteriores (Jiménez et al., 2018). Por lo tanto, el T13 no puede considerarse como el tratamiento óptimo.

En cambio, el T11 resultó ser más adecuado (3.5 cm) sin manifestaciones visibles de hiperhidricidad. Estos resultados sugieren que una frecuencia de inmersión cada 24 horas, en combinación con tiempos breves y una mayor concentración de BAP, promueven un crecimiento vigoroso y de buena calidad fisiológica. Esto concuerda con lo reportado por Gonzales et al., (2001), quienes destacaron que las condiciones físicas del sistema de inmersión temporal son determinantes en la actividad fotosintética y la calidad y estructura de las plantas.

Por otro lado, el análisis factorial de 4 variables independientes reveló que sugiere la presencia de citoquininas como BAP, para la estimulación de división celular y la activación de las yemas. Siendo que un SIT las condiciones físicas juegan un papel más determinante en la elongación efectiva de los explantes (Albarrán et al., 2005).

Asimismo, la concentración de IBA, en el análisis factorial, no mostro un efecto sobresaliente, lo que concuerda con estudios previos que reportan que las auxinas son más eficaces cuando actúan en combinación con otros reguladores de crecimiento, facilitando los procesos de elongación (George et al., 2008).

Godoy (2017) consideró brotes viables de 1.5 cm de longitud de tallo en comparación con este estudio que obtuvo hasta 3.5 cm (T11), por ende, este resultado se considera favorable ya que en la evaluación morfológica los tallos estaban saludables sin malformaciones y sin signos de hiperhidricidad.

Los resultados obtenidos confirman que no es suficiente optimizar un único factor para maximizar la longitud de brotes. Por el contrario, se requiere un ajuste simultaneo de las condiciones hormonales y físicas.

Evaluación del área foliar de cada hoja de los brotes por tratamiento:

Los explantes estuvieron durante 25 días en los medios de multiplicación, tanto en biorreactores plantform como el de medio semisólido. Al terminar este periodo, se midió cada hoja de cada brote por tratamiento; tanto el largo como el ancho, obteniendo los datos que figuran en la Tabla 13.

Tabla 13

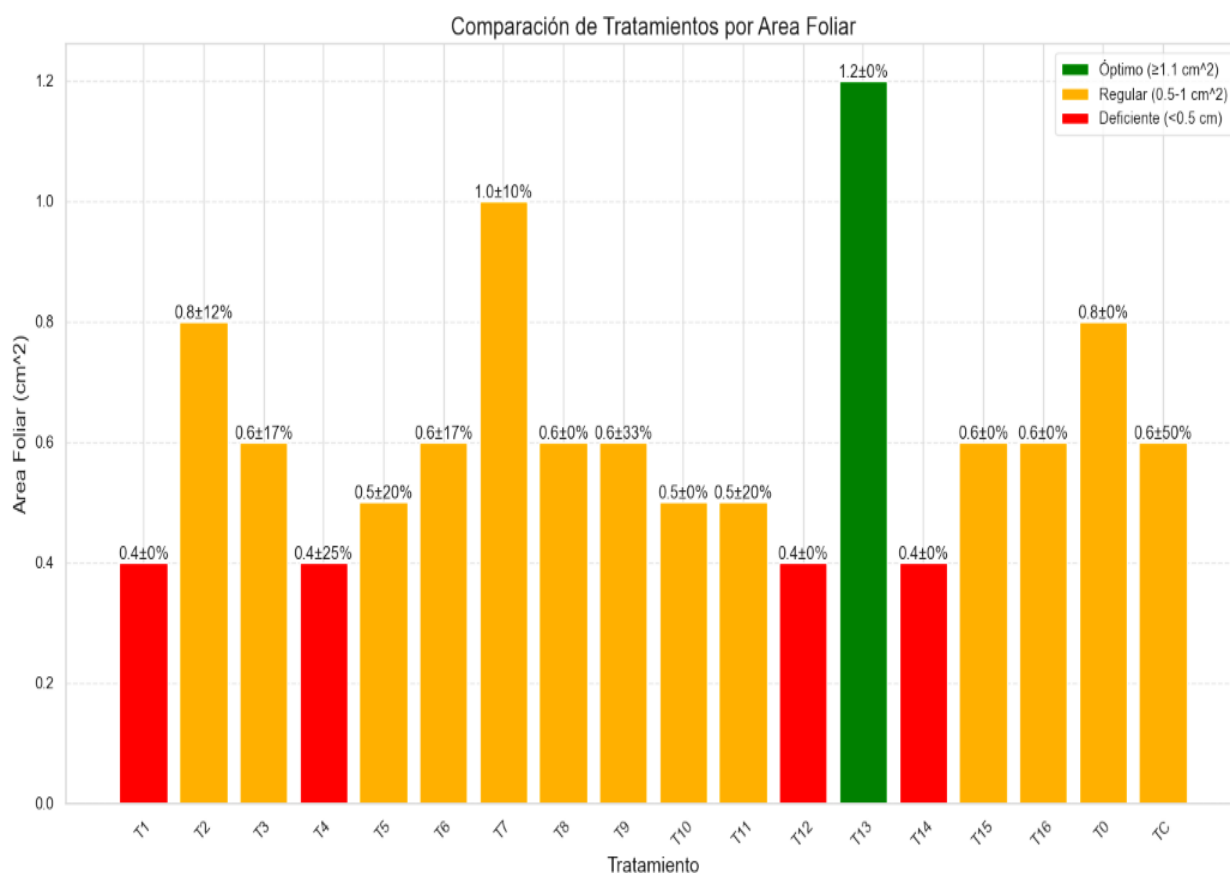
Evaluación del área foliar de cada tratamiento

Tratamiento	Área foliar (cm2)	
	media	desviación estándar
TC	0.6	0.3
T0	0.8	0
T1	0.4	0
T2	0.8	0.1
T3	0.6	0.1
T4	0.4	0.1
T5	0.5	0.1
T6	0.6	0.1
T7	1	0.1
T8	0.6	0
T9	0.6	0.2
T10	0.5	0
T11	0.5	0.1
T12	0.4	0
T13	1.2	0
T14	0.4	0
T15	0.6	0
T16	0.6	0

Nota: Según se indica en la Tabla 13, los mejores resultados con respecto al área foliar en el T13 y T7.

Figura 20

Comparación de tratamientos – Área foliar



Nota: En la figura 20 se visualiza que el Tratamiento T13 tiene una media de 1.2 (área foliar óptima) y una desviación estándar de 0 (nula variabilidad) seguido del T7 con una media de 1.

En el Análisis de varianza (Tabla 14): se observa que la diferencia entre tratamientos es mayor a la variación dentro de cada tratamiento en la suma de cuadrados y el estadístico F. Además, los tratamientos sí tienen un efecto estadísticamente significativo en el área foliar. El T13 está significativamente diferenciado de los demás.

Tabla 14

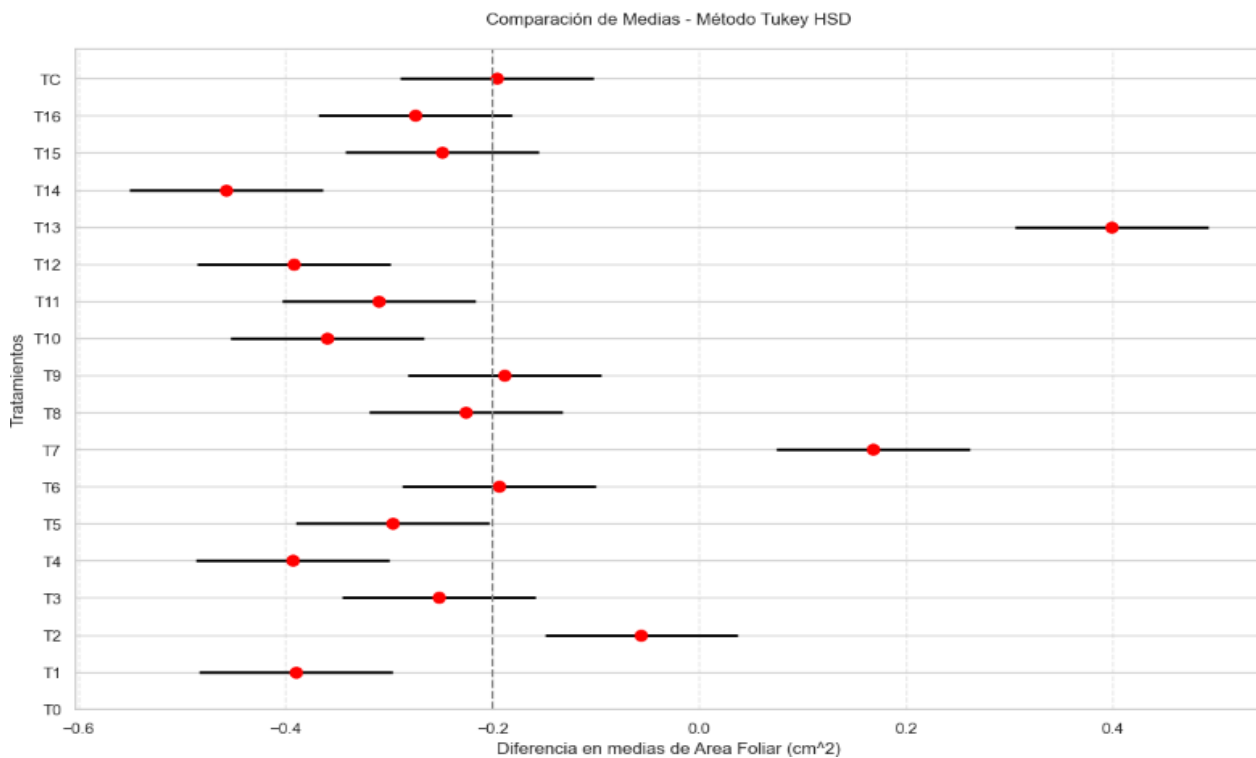
ANOVA de los tratamientos para evaluar el Área foliar

	suma de cuadrados	grados de libertad	estadístico F	PR(>F)
Tratamiento	23.670789	17	130.793292	1.51E-175
Residual	5.557108	522		

Nota. El análisis de varianza (ANOVA) que se muestra en la Tabla 14, indica que las diferencias entre los tratamientos son significativamente mayores que la variabilidad dentro de cada tratamiento, lo que se refleja en la suma de cuadrados y el valor del estadístico F.

Figura 21

Comparación de medias del Área foliar -Método Tukey HSD



Nota. La figura 21 muestra la prueba de comparación de medias en Tukey, en el cual el T13 tiene mayor área foliar, seguido del T7; siendo así significativamente diferenciados de los demás tratamientos.

La prueba de comparación de medias en Tukey mostró que el tratamiento 13 obtuvo la mayor área foliar con 1.2 cm², seguido del T7 con 1 cm², superando así al T0 (0.8 cm²) y TC (0.6 cm²).

Tabla 15

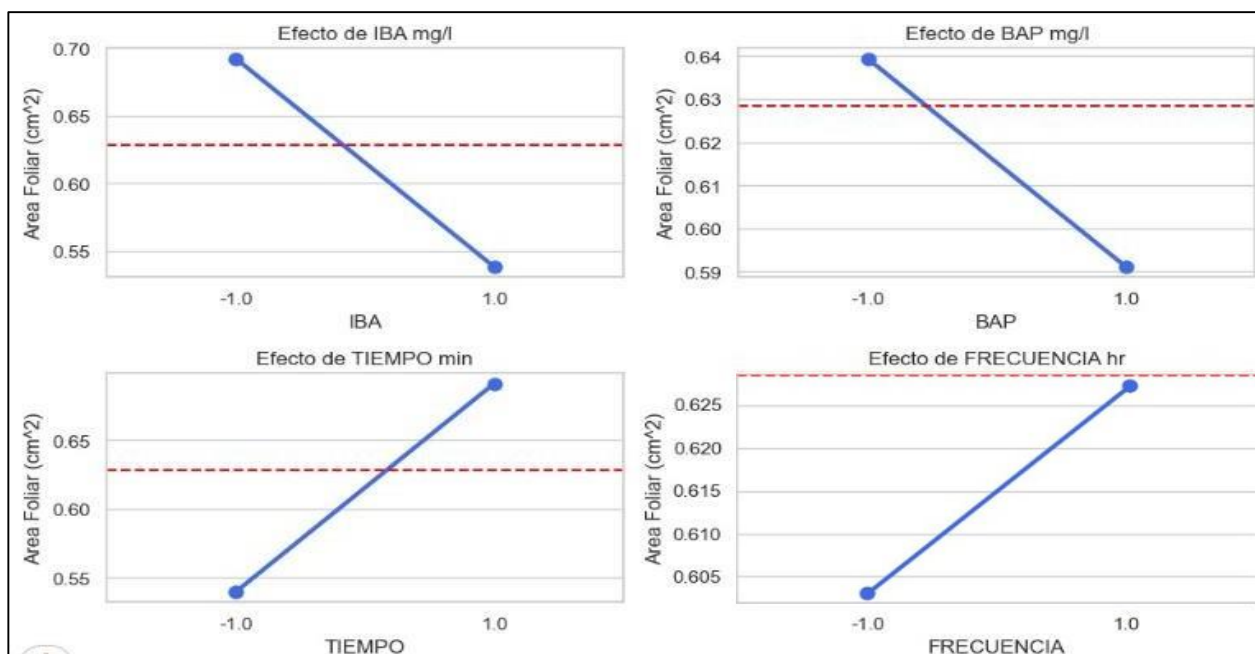
ANOVA del diseño factorial de 4 variables independientes del Area foliar

	<u>suma de cuadrados</u>	<u>df</u>	<u>estadístico F</u>	<u>PR(>F)</u>
IBA: BAP: FRECUENCIA	6.702147	1	1077.08238	5.04E-123
IBA	2.854033	1	458.663336	2.89E-71
TIEMPO	2.747697	1	441.574276	2.23E-69
IBA: TIEMPO	2.319653	1	372.784567	2.13E-61
IBA: FRECUENCIA	2.016484	1	324.063226	2.46E-55
BAP: TIEMPO: FRECUENCIA	1.661737	1	267.052945	9.58E-48
BAP: FRECUENCIA	1.363505	1	219.124945	6.94E-41
IBA: BAP: TIEMPO: FRECUENCIA	1.086842	1	174.663236	4.54E-34
IBA: BAP: TIEMPO	0.971528	1	156.131391	4.38E-31
BAP	0.279879	1	44.978546	5.81E-11
BAP: TIEMPO	0.192347	1	30.911598	4.56E-08
FRECUENCIA	0.070583	1	11.343118	8.20E-04
IBA: TIEMPO: FRECUENCIA	0.039472	1	6.343387	1.21E-02
TIEMPO: FRECUENCIA	0.029688	1	4.771088	2.94E-02

Nota: El análisis factorial de cuatro variables independientes evaluadas (Tabla 15) **sobre** el área foliar de brotes de *Prunus* sp, mostró que él IBA fue la variable independiente más influyente por los valores más altos en diferencias de cuadrados y el valor P, pero la combinación de IBA, BAP y frecuencia de inmersión explica la gran parte de variabilidad de los resultados, siendo así el T13 la combinación que obtuvo la mayor área foliar.

Figura 22

La combinación sugerida fue el tratamiento 13.



Nota: En la figura 22, demuestra que la interacción de las variables independientes donde se obtuvo mayor área foliar fue en T13: 0.1 mg/l IBA, 0.5 mg/l BAP, tiempo y frecuencia de inmersión de 6 min cada 24 h.

El análisis comparativo entre los resultados sugiere al T13 con 1.2 cm² de área foliar como el tratamiento óptimo, sin embargo, en la evaluación morfológica (Anexo 3) las plantas de este tratamiento presentaron hiperhidricidad; hojas muy largas y estrechas (Sharry *et al*, 2015), alterando los procesos fisiológicos y el desarrollo óptimo de las hojas; esto generaría baja tasa de supervivencia en las siguientes etapas del proceso in vitro (Jiménez *et al.*, 2018), por ello no se recomienda este tratamiento.

El tratamiento 7 ocupa el segundo lugar con mayor área foliar de 1 cm², siendo el más adecuado ya que no presentaba características visibles de hiperhidricidad (Anexo 3). El valor de las variables independientes en este tratamiento fue: 0.1 mg/l IBA, 1 mg/l BAP, tiempo y frecuencia de inmersión de 6 min cada 12 h., donde la variable más influyente es el fitorregulador IBA según el análisis factorial, si bien es cierto, dentro de sus funciones principales de las auxinas es la generación de raíces, también puede gatillar la formación de hojas al usar mínimas concentraciones y en combinación con una citoquinina, en este caso el BAP (George et al, 2008). Siendo así la combinación de IBA, BAP y frecuencia de inmersión (6 min) que presentó la gran parte de variabilidad de los resultados.

Las plantas *in vitro* al tener un área foliar aceptable, indica una mayor capacidad fotosintética; generando un mejor desarrollo. Pero si las hojas presentan un área foliar excesivo puede ser resultado de la inadecuada dosificación de los fitorreguladores. El área foliar también depende del tipo de cultivo que se esté micropropagando (Gago et al, 2022).

Un área foliar de 1 cm² en una hoja de planta *in vitro* de cerezo es funcional, ya que, según la evaluación morfológica realizada en esta investigación, estas hojas estaban bien definidas sin ningún síntoma de hiperhidricidad ni estrés; lo que contribuye a la capacidad de la planta para generar energía, crecer y continuar con las siguientes etapas del cultivo *in vitro* como es la elongación o el enraizamiento. En Perú la micropropagación masiva de cerezo es un campo que ha sido poco explorado, y no se ha encontrado estudios previos que utilicen sistemas de inmersión temporal para evaluar el crecimiento, desarrollo y calidad de plantas de cerezo *in vitro*. Esta falta de conocimientos limita la capacidad de optimizar la producción de plantas de este cultivo en el país y aprovechar sus beneficios potenciales para la agricultura y la economía. En este estudio, se busca llenar esta brecha de conocimiento y contribuir al avance del conocimiento científico en

este campo. Los resultados de esta investigación serán relevantes para la comunidad científica y la industria agrícola, y pueden ser utilizados para mejorar la producción de plantas *in vitro* de cerezo en el Perú.

Evaluación de la concentración de clorofila de cada tratamiento en plantform

Se evaluaron 16 tratamientos y se compararon con los resultados del tratamiento convencional (TC) y el tratamiento 0 (T0) para optimizar la concentración de clorofila en plántulas *in vitro* en biorreactores plantform.

Tabla 16:

Contenido de Clorofila en hojas in vitro de Cerezo de cada tratamiento

CONCENTRACIONES DE CLOROFILA (mg/g.m.s)			
Tratamientos	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila Total
TC	14.3 ± 0.2	4.3 ± 0.3	18.6 ± 0.4
T0	6.5 ± 0.0	2.2 ± 0.0	8.6 ± 0.1
T1	9.3 ± 0.9	2.9 ± 0.4	12.2 ± 1.3
T2	11.0 ± 0.2	3.8 ± 0.1	14.8 ± 0.3
T3	12.7 ± 0.1	4.2 ± 0.1	16.9 ± 0.3
T4	11.4 ± 0.0	2.6 ± 0.0	14.1 ± 0.1
T5	14.1 ± 0.1	4.2 ± 0.0	18.3 ± 0
T6	16.1 ± 0.0	4.9 ± 0.0	20.9 ± 0
T7	15.1 ± 0.1	4.7 ± 0.1	19.8 ± 0.2
T8	14.3 ± 0.3	4.3 ± 0.2	18.6 ± 0.5
T9	10.5 ± 0.4	3.3 ± 0.1	13.8 ± 0.5
T10	15.1 ± 0.0	4.5 ± 0.0	19.6 ± 0
T11	11.6 ± 0.1	4.3 ± 0.0	15.8 ± 0.1
T12	7.3 ± 0.0	2.2 ± 0.0	9.4 ± 0
T13	6.5 ± 0.1	2.2 ± 0.1	8.7 ± 0.2
T14	9.7 ± 0.0	3.2 ± 0.0	12.8 ± 0.1
T15	14.4 ± 0.1	4.6 ± 0.1	19 ± 0.2
T16	11.3 ± 0.2	3.5 ± 0.3	14.8 ± 0.5

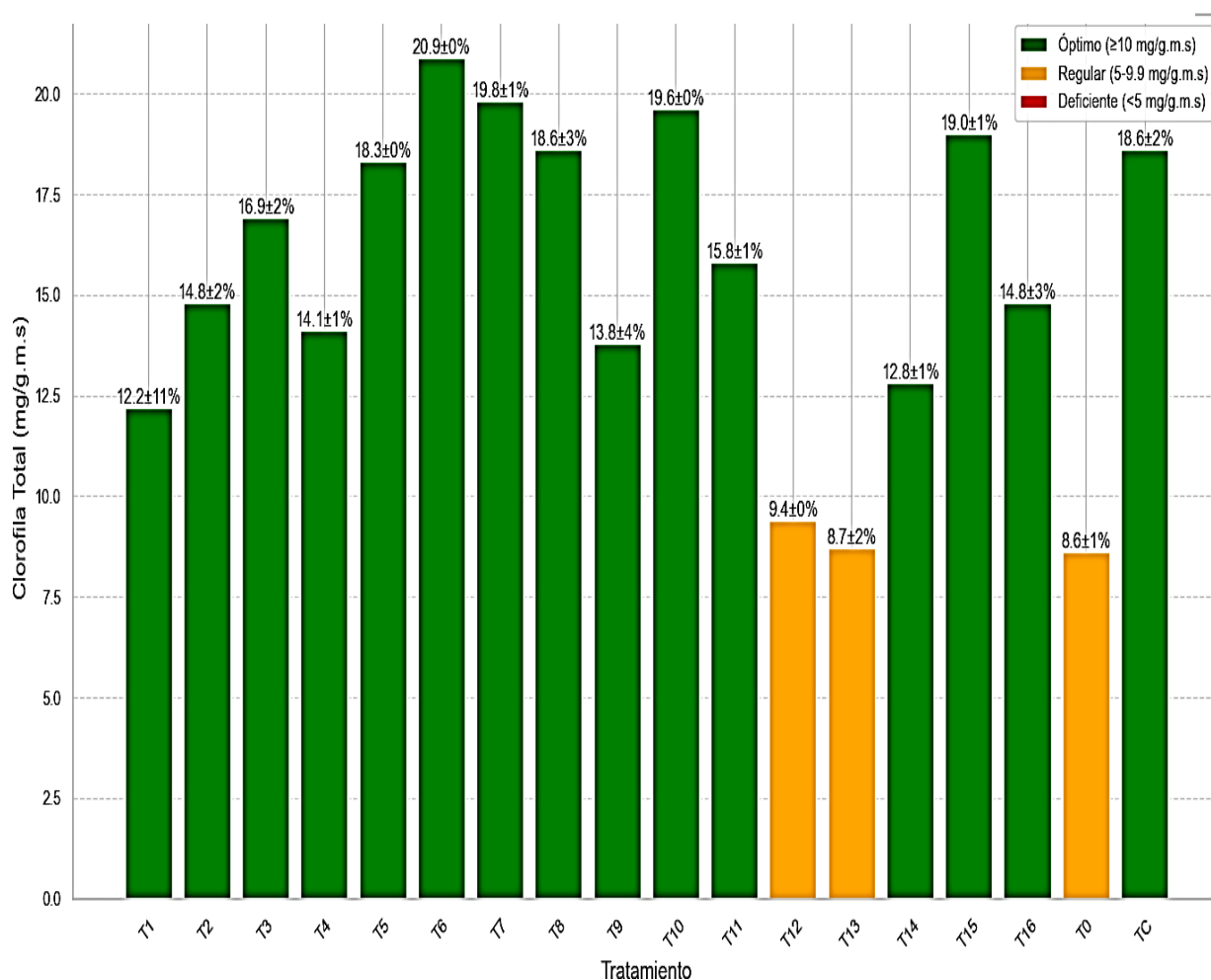
Nota: Top 5 Tratamientos de los mejores tratamientos para Clorofila Total: T6: 20.93 mg/g.m.s.,

T7: 19.83 mg/g.m.s., T10: 19.63 mg/g.m.s., T15: 19.00 mg/g.m.s. s, TC: 18.63 mg/g.m.s.

El análisis de varianza (Tabla 17) reveló que los tratamientos sí tienen un efecto estadísticamente significativo en la clorofila total. Los tratamientos T6, T7 y T10 están conectados por una barra, significa que no hay diferencias estadísticas entre ellos, aunque numéricamente $T6 > T7 > T10$.

Figura 23:

Comparación de tratamientos por clorofila total



Nota: visualización de Tratamientos, donde indica que el tratamiento T6 un alto contenido de clorofila total

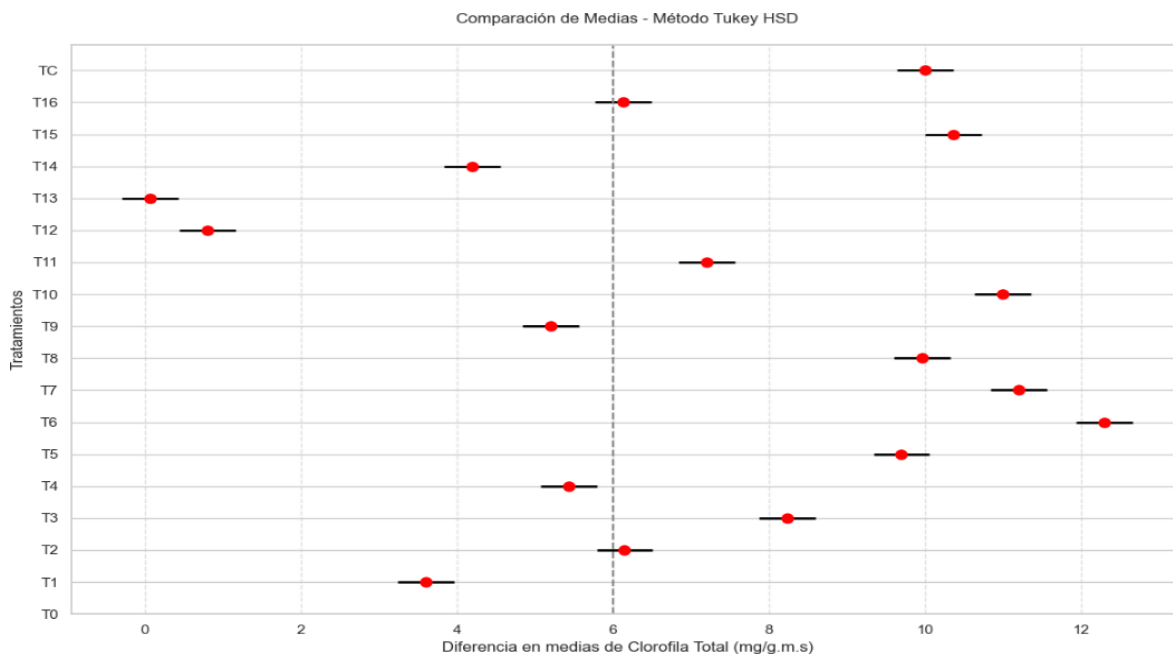
Tabla 17:

ANOVA de los 16 tratamientos para evaluar clorofila total

	suma de cuadrados	grados de libertad	estadístico F	PR(>F)
Tratamiento	7820.870833	17	2897.698217	0.00E+00
Residual	82.875	522		

Figura 24:

Comparación de medias- método tukey y diferencias en medias de clorofila total



Nota: La prueba de comparación de medias en Tukey mostró que los tratamientos T6, T7 y T10 obtuvieron mayores valores de clorofila total, superando incluso al TC (Figura 24).

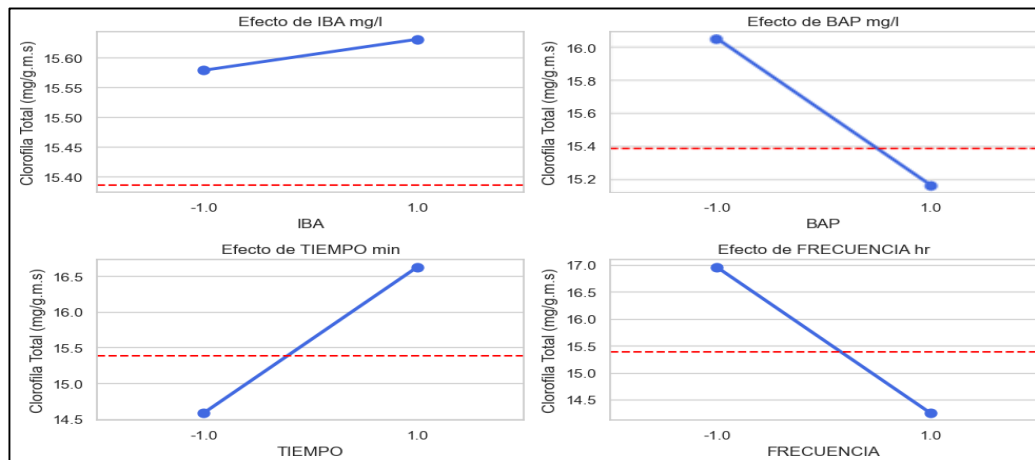
Tabla 18:*ANOVA del diseño factorial de 4 variables independientes de clorofila total*

Variables	suma de cuadrados	df	F	PR(>F)
IBA: BAP	1659.492187	1	9955.880293	1.164966e-315
BAP: TIEMPO: FRECUENCIA	1189.125521	1	7133.984377	7.80E-284
TIEMPO: FRECUENCIA	1007.750521	1	6045.851632	2.94E-268
FRECUENCIA	876.150521	1	5256.336709	3.14E-255
TIEMPO	499.188021	1	2994.805409	1.59E-204
BAP: TIEMPO	461.188021	1	2766.829975	1.18E-197
IBA: BAP: FRECUENCIA	242.963021	1	1457.621054	2.81E-145
BAP	94.963021	1	569.716733	9.73E-83
IBA: BAP: TIEMPO	53.667187	1	321.96843	4.56E-55
IBA: BAP: TIEMPO: FRECUENCIA	10.063021	1	60.371619	5.09E-14
IBA: TIEMPO	8.400521	1	50.397694	4.74E-12
IBA: FRECUENCIA	6.188021	1	37.124125	2.33E-09
IBA: TIEMPO: FRECUENCIA	2.338021	1	14.026614	2.03E-04
BAP: FRECUENCIA	1.692188	1	10.152031	1.54E-03

Nota: El análisis factorial (Tabla 18) evidencio que la frecuencia de inmersión fue el factor más influyente sobre la concentración de clorofila, seguida del tiempo de inmersión y de la interacción de IBA y BAP. De manera específica, concentraciones de BAP (0.5 a 1 mg/L) y tiempos de inmersión prolongados de 6 minutos favorecieron el incremento de clorofila, mientras que frecuencias de inmersión cada 24 horas afectaron negativamente esta medida

Figura 25:

Representación de la combinación sugerida T6



Nota: La combinación sugerida T6 (0.5 mg/L, 0.5 mg/L BAP, 6 min de frecuencia, 12 horas), (+) (-) (+) (-).

La Frecuencia de Inmersión representa la variable más influyente por los valores más altos en la diferencia de cuadrados y el valor P. La combinación de IBA y BAP explica la gran parte de variabilidad.

Esto sugiere que una frecuencia excesiva de inmersión puede inducir estrés hídrico y afectar negativamente la formación de clorofila, en concordancia con lo señalado por Jiménez et al. (2018), que describe efectos adversos de la hiperhidricidad en cultivos in vitro sometidos a inmersión prolongada. A su vez, estos resultados coinciden con lo reportado por Gonzales et al. (2021), quienes destacaron que las condiciones físicas del sistema de inmersión temporal son determinados en la actividad fotosintética. También, Rodríguez y Pérez (2019) señalaron que inmersiones prolongadas o poco frecuentes pueden limitar la formación de pigmentos fotosintéticos, como se observó en los tratamientos con frecuencia de inmersión de 24 horas. La

interacción equilibrada entre la concentración hormonal y las condiciones de inmersión (T6), resultado clave para optimizar la producción de clorofila en este estudio.

Además, Rodríguez et al. (2006) demostró que frecuencias de inmersión más prolongadas pueden limitar la formación de clorofila debido a la aparición de estrés fisiológico en las plántulas cultivadas *in vitro*. Los resultados obtenidos en el T6, que muestran una concentración de clorofila de 20.9 mg/g.m.s, sugieren un estado fisiológico óptimo de las plantas. Esta concentración de clorofila indica una mayor capacidad fotosintética, lo que a su vez se relaciona con un mejor estado general de salud y vitalidad de las plantas. No obstante, es importante considerar que la concentración óptima de clorofila puede variar en función de factores como la especie de portainjerto de cerezo, la etapa de desarrollo, las condiciones ambientales y la disponibilidad de nutrientes, lo que puede influir en la interpretación de estos resultados.

V. CONCLUSIONES:

- El tiempo y frecuencia de inmersión óptimo entre los tratamientos fue de 6 min cada 12 h.
- Las concentraciones de hormonas más eficientes entre todos los tratamientos en plantform fue: IBA 0.1 mg/l, BAP 1 mg/l.
- Se obtuvo la mayor tasa de multiplicación empleando biorreactores plantform en el T7 con 4.5 brotes, cuyo medio líquido estaba compuesto por sales DKW, IBA 0.1 mg/l, BAP 1 mg/l, tiempo y frecuencia de inmersión de 6 min cada 12 h.
- El área foliar aceptable lo obtuvo el tratamiento 7 con 1 cm² ya que no presentó características visibles de hiperhidricidad.
- En cuanto a la longitud de brotes, el T11 con 0.1 mg/l IBA, 1 mg/l BAP, tiempo y frecuencia de inmersión de 4 min cada 24 h; resultó ser más adecuado con una longitud de brotes de 3.5 cm, además, no presentó hiperhidricidad.
- El T6 (0.5 mg/l IBA, 0.5 mg/l BAP, tiempo y frecuencia de inmersión de 6 min cada 12 hr) obtuvo los valores más altos de clorofila, 20.9 mg/g.m. s.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda validar las condiciones óptimas determinadas en este estudio en otros portainjerto y variedades de *Prunus* sp, para evaluar su aplicabilidad a nivel comercial.
- En futuras investigaciones se recomienda adicionar la evaluación de los parámetros morfológicos de masa seca y masa fresca; esto proporcionaría más información sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas *in vitro*.
- Se aconseja realizar estudios adicionales que evalúen la respuesta fisiológica y bioquímica de las plantas propagadas en SIT durante la etapa de aclimatación, para asegurar que la concentración de clorofila observada *in vitro* se traduzca en un mejor desempeño *ex vitro*
- Se sugiere realizar nuevos ensayos como combinaciones de antioxidantes o biocidas, como estrategia para minimizar el estrés oxidativo y contaminación bacteriana.

VII. REFERENCIAS

- Abreu, E., Sosa del Castillo, M., Ascunce del Sol, G. y González, G. (2016). Efecto de antibióticos en la propagación in vitro de *Agave fourcroydes* Lem. *Biotecnología Vegetal*, 16(1). <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/507>
- Agencia agraria de noticias. (2024). Cereza se abre camino y podría desplazar a arándanos en exportaciones. <https://agraria.pe/noticias/cereza-se-abre-camino-y-podria-desplazar-a-arandanos-en-expo-36835>
- Aguilera, D. (2020). Aplicaciones de la biotecnología vegetal para la micropropagación de cactáceas (Universidad de Tarapacá. Arica-Chile).
- Alarcón, J., Martínez, D., Quintana, J., Jiménez, S., Díaz, A. y Jiménez, I. (2008). IN VITRO propagation of *Renealmia alpina* (Rottb), plant against snakebite. *Vitae*, 15 (1): 61-69.
- Albarrán, J., Bertrand, B., Lartaud, M. y Etienne, H. (2005). Cycle characteristics of the temporary immersion system RITA® during in vitro culture of coffee (*Coffea arabica* L.) somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82(2), 225-232. <https://doi.org/10.1007/s11240-005-0505-3>
- Alcántara, J., Acero, J., Alcántara, J. y Sánchez, R. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *NOVA*, 17(32), 109-129. <https://doi.org/10.25058/24629448.3639>
- Al-Shareefi, M., Abduhussein, M. y Abbass, J. (2020). In vitro shoot multiplication affected by light and culture system in potato. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 21 (39 & 40), 92-101.
- Alvarenga, S., Salazar, T. (2015). Micropropagación masiva de *Stevia rebaudiana* Bertoni en sistemas de inmersión temporal. *Instituto Nacional de Ciencias Agrícola*, 36 (4): 50-57.
- Bardales, J. E. (2004). Propagación "in vitro" de distintas especies de "Prunus". (Universidad Nacional Amazónica Peruana. Iquitos. IRNAS- CSIC.)
- Barrero, L. (2009). Caracterización, evaluación y producción de material limpio de mora con alto valor agregado. *Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica)*.

- Bello, J., Cruz, C. y Pérez, J. (2019). Un nuevo sistema de inmersión temporal para la micropropagación comercial de banano (*Musa AAA cv. Grand Naine*). *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*, 55, 313–320. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-09973-7>
- Bello, J., Martínez, E., Morales, V. y Caamal H. (2014). Comparación de tres sistemas de biorreactores para la micropropagación comercial de caña de azúcar
- Benegas, R., Dolores, M., Candan, A., Calvo, P., y Mañueco, M. (2013). Variedades de cereza en el Alto Valle. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Centro Regional Patagonia Norte, Estación Experimental Agropecuaria Alto Valle. 2da edición. p. 5-10
- Berthouly, M. y Etienne, H. (2005). Temporary immersion system: A new concept for use liquid medium in mass propagation. In *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation* (pp. 165-195). Springer. https://doi.org/10.1007/1-4020-3200-5_10
- Boeri, P. (Ed.). (2015). Nutrientes para las plantas de probeta medios de cultivo- reguladores de crecimiento. 1a ed. adaptada. Cap. 3, (pp. 46-70).
- Cáceres, K. J. (2004). Propagación in vitro de los portainjertos de cerezo (*Prunus avium L.*) Gisela 5 y *Prunus cerasus*. Quillota [Tesis de pregrado] Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.
- Canales, A. E. (2019). Evaluación del estado hídrico e intercambio gaseoso de un huerto de cerezo (cv. "Santina") bajo cobertores plásticos de distinta densidad [Tesis de pregrado] Universidad de Talca.
- Castillo, A. L., Moreno, A. y García, R. (2020). Eficiencia del sistema de inmersión temporal frente al método de propagación convencional in vitro. *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 3(2), 173 -182.
- Castillo, A., Ashfield, R., Bentancor, M., Bentancor, L., Bonilla, M., Ceppa, M., Franco, R., Silva, N., Cabrera, D., Rodríguez, P. y Zoppolo, R. (2019). Micropropagación de plantas en biorreactores de inmersión temporal (BIT). *INIA- Unidad de Biotecnología* (56), 88-91.
- Cittadini, E.D., Peri, P.L. (2006). Estimation of leaf área in sweet cherry usng a non-destructive method. *RIA*, 35 (1): 143-150.

- Damiano, C., Gentile, A., La Starza, S. R., Frattarelli, A. y Monticelli, S. (2003). Automation in micropropagation through temporary immersion techniques. *Acta Horticulturae*, (616), 359–364.
- Dasilva, D., Sánchez, C., Idrey, A., Vielba, J., Martínez, R. y Vidal, N. (2018). Propagación y enraizamiento de *Prunus avium* por sistemas de inmersión temporal y continua. Conferencia Internacional de la IUFRO Unit: Árboles clonales en la era de la bioeconomía: oportunidades y desafíos en Coimbra, Portugal. Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia. Ampliación del CSIC.
- Debnath, S., y Arigundam, U. (2020). In vitro propagation of strategies of medicinally important Berry crop, lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.). *Agronomy*, 10 (5): 744. <https://doi.org/10.3390/agronomy10050744>
- Delfino, p., Rivata, R., y Bima, P. (2020). Sistema de inmersión temporal (sit): alta eficiencia en la propagación in vitro del portainjerto híbrido *Prunus persica* x *P. amygdalus*. *Nexo agropecuario*, 8(1), 13-17.
- Díaz, A. (2019). Cultivo de brotes de *Tecoma stans* para la producción de compuestos fenólicos en sistemas de inmersión temporal automatizado. https://www.unpa.edu.mx/tesis_Tux/tesis_digitales/maestria_biotechnologia/MB47._DIAZ_TORAL_ABRIL_CRISALIDA.pdf
- Ellena M. (2003). Variedades de cerezo en la zona sur de Chile. *Tierra Adentro*. no. 53. <https://hdl.handle.net/20.500.14001/6057>
- Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro. Cali, Colombia (pp. 30-33) CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1991.
- Escalona, M., Lorenzo, J., González, B. y Daquinta, M. (2018). Efecto de la frecuencia y duración de la inmersión sobre la producción de plántulas en sistemas de inmersión temporal. *Revista Biotecnología Vegetal*, 18(3), 229–237
- Etienne, H. y Berthouly, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3), 215–231. <https://doi.org/10.1023/A:1015668610465>
- Fernández, S. (2020). Diseño de experimentos: Diseño factorial. [Tesis de maestría] Universidad Politécnica Catalunya. Barcelona. España.

- Fundación para la Innovación Agraria (2009). Resultados y Lecciones en Sistema de Inmersión Temporal en Especies Anuales, Frutales y Vides Proyecto de Innovación en Regiones Metropolitana, del Maule, del Bío-Bío y de Los Ríos. 58pag. <http://bibliotecadigital.fia.cl/handle/20.500.11944/2107>
- Gago, D. (2020). Micropropagación y análisis bioquímico de mimbrera, castaño y ciruelos cultivados en biorreactores con diferentes concentraciones de sacarosa. (Tesis doctoral, Universidad de A Coruña).
- Gago, D., Sánchez, C., Aldrey, A., Christie, C. B., Bernal, M. Á., y Vidal, N. (2022). Micropropagation of Plum (*Prunus domestica* L.) in Bioreactors Using Photomixotrophic and Photoautotrophic Conditions. *Horticulturae*, 8(4), 286. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8040286>
- Gárate., M. (2010). Técnicas de propagación por estacas. <https://repositorio.unu.edu.pe/search?spc.page=1&query=T%C3%A9cnicas%20de%20propagaci%C3%B3n%20por%20estacas>.
- Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D. y Thorpe, T. (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 32, 272–289. <https://doi.org/10.1007/BF02822700>
- George E., Hall, M. y Klerk G. (Eds.). (2008). Reguladores del Crecimiento Vegetal I: Introducción; Auxinas, sus Análogos e Inhibidores. En *Propagación de plantas por cultivo de tejidos*, pp. 175–204. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-2>
- George, E., Hall, M. y Klerk, G. (2007). Plant Propagation by Tissue Culture. George E., y Klerk G. (Eds), *The Components of Plant Tissue Culture Media I : Macro- and Micro-Nutrients*, pp. 65-70. doi:10.1007/978-1-4020-5005-3
- Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A. y Bley, T. (2014). Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in Life Sciences*. 14: 607-621. DOI: 10.1002/elsc.201300166.
- Godoy, S., Tapia, E., Seit, P., Andrade, D., Sánchez, E., Andrade, P., y Prieto, H. (2017). Temporary immersion systems for the mass propagation of sweet cherry cultivars and cherry rootstocks: development of a micropropagation procedure and effect of culture conditions on plant quality. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 53(5), 494–504.

- González, L., Martínez, R. y Cruz, J. (2021). Optimización de sistemas de inmersión temporal para la producción de plantas in vitro. *Revista Fitotecnología*, 31(2), 134–144.
- González, L., Ramírez, A. y Díaz, S. (2021). Impacto de los sistemas de inmersión temporal en la fisiología de plantas cultivadas in vitro. *Revista Latinoamericana de Biotecnología*, 12(3), 45-56.
- Griffis, J., Emrah, I. y Ercan, M. (2023). Comparison of a conventional semisolid medium system with the Plantfom TM Bioreactor system: micropropagation of *Cordyline fruticosa* ‘Purple’ and *Aronia melanocarpa* ‘Viking’. *Technology in Horticulture* 3-17. <https://doi.org/10.48130/TIH-2023-0017>
- Iglesias, L. G. (2018). Establecimiento de un sistema de biorreactores para la micropropagación de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews). *Agro Productividad*, 7(3). <https://revistaagroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/526>
- Jiménez, V. M., Castillo, J. y Arias, J. (2018). Efectos de la hiperhidricidad inducida por inmersiones prolongadas en cultivos in vitro. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(1), 45–53.
- Jiménez, V. M., Castro, P. y Guevara, E. (2018). Hiperhidricidad en plantas cultivadas in vitro: causas, efectos y estrategias de mitigación. *Agronomía Mesoamericana*, 29(1), 223-241. <https://doi.org/10.15517/am.v29i1.32564>
- Karakoyun, M., Eroglu, A., Arikan, S y Ipek M. (2023). In vitro Micropropagation of fruit species using next generation bioreactors. *Selcuk Journal of Agricultural and Food Sciences*, 37 (1), 200-209.
- Kunakhonnuruk, B. (2018). Development of modified temporary immersion technology for mass propagation of some valuable plants. (Tesis de doctorado, Universidad de Naresuan).
- Labra, E., Astudillo, O., y Riquelme, J. (2005). Fruticultura: Establecimiento de Huertos de Cerezo. Villa Alegre - Chile: Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Boletín INIA N°130, 89 p.
- Lemus S. G. (Ed.). (2005). El cultivo del cerezo. Santiago, Chile: Boletín INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias. no. 133. <https://hdl.handle.net/20.500.14001/7061> (Consultado: 7 julio 2024).

- Lemus, G. ed. (2005) El Cultivo del Cerezo. Santiago, Chile, Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Boletín INIA Nº 133.256 pp.
- Levitus G., Echenique V., Rubinstein C., Hopp E. y Mroginski L. (2010). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. En L. Mroginski, P. Sansberro, E. Flaschland (Eds.), Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales (pp. 20-22). Argentina. ArgenBio. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuario
- Llano, C. (2015). Micropropagación in vitro de piña, *Ananas comosus* (L.) Merr Var. MD2 (Bromeliaceae) bajo un sistema de inmersión temporal. <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/item/74db33d9-da9c-4a0d-bb64-832ca9544438>.
- Loewe, V., Delard, C. y Pineda, G. (2001). Cerezo común (*Prunus avium*). Una alternativa para producir madera de alto valor. Santiago, Chile: INFOR. <https://doi.org/10.52904/20.500.12220/824>
- Martínez, L. y Gago, J. (2008). Micropropagación Vegetal. Universidad de Vigo.
- Martínez, M. (2023). Micropropagación de pitahaya (*Hylocereus undatus*) en sistemas de inmersión temporal.
- Miranda, M. E. y Fernández, J. (2015). El cerezo de origen gallego para uso forestal. Santiago de Compostela: Centro de Investigación Forestal de Lourizán. Xunta de Galicia.
- Montecinos, M. (2021). Calidad y Condición de Cerezas (*Prunus Avium* L.) CV. Santina, Lapins y Regina a cosecha y luego de guarda en frío. [Tesis] Universidad de Talca. Chile.
- Montgomery, D. (2008). Diseño y Análisis de experimentos. (2^{da} Ed.). Limusa Wiley.
- Muñiz, R. (2018). La propagación in vitro de plantas con sistemas de inmersión temporal. Una tecnología apropiada para la agricultura sostenible. *Tekhné* 21 (3): 43-50.
- Murthy, H., Joseph, K., Paek, K. y Park, S. (2023). Bioreactor systems for micropropagation of plants: present scenario and future prospects. *Frontiers in plant science*, 14. doi: 10.3389/fpls.2023.1159588
- Nasri, A., Baklouti, E., Ben Romdhane, A., Maalej, M., Schumacher, H. M., Drira, N. y Fki, L. (2019). Large-scale propagation of *Myrobalan* (*Prunus cerasifera*) in RITA® bioreactors and ISSR-based assessment of genetic conformity. *Scientia Horticulturae*, 245, 144–153. doi: 10.1016/j.scienta.2018.10.016

- Ñahuinlla, M. E. (2018). Optimización del protocolo de Micropropagación in vitro con cuatro cultivares de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.). (Universidad Nacional Agraria la Molina-Lima)
- Ortiz, M. (2024). Historias empresariales. Redagícola
- Ortiz, M. (2024). Los ensayos detrás de un cultivo rentable. Redagricola, (2), p-1.
- Othmani, A., Mzid, R., Bayoudh, C., Trifi, M., y Drira, N. (2011). Bioreactors and automation in date palm micropropagation. *Date palm biotechnology*, 119-136
- Paredes, M. (2005). Sistema de Inmersión temporal en Bioreactores: Nueva tecnología en micropropagación de plantas en Chile. *Revista Biotecnología TierraAdentro*. núm 62. <https://biblioteca.inia.cl/server/api/core/bitstreams/f41cda65-b00b-4f0d-bc49-e92532664978/content>
- Perea, M. (2009). Cultivo de Tejidos Vegetales In Vitro. (Universidad Nacional de Colombia).
- Pérez, A. (2020). Optimización de la fotosíntesis en cultivos in vitro mediante sistemas de inmersión temporal. *Agronomía Mesoamericana*, 31(2), 457–469.
- Perugorriá, M. (2012). Desarrollo de una técnica para micropropagación de especies leñosas en biorreactores. Universidad de la República, Facultad de Ciencias. Uruguay: UR.FC. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/3974>
- Rademacher, W. (2015). Reguladores del crecimiento vegetal: antecedentes y usos en la producción vegetal. *Revista de Regulación del Crecimiento Vegetal*, 34(4), 845–872. doi:10.1007/s00344-015-9541-6
- Ramos, J. (2012). Avances de la micropropagación in vitro de plantas leñosas. Especialización en Biotecnología Agraria. (Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Bogotá).
- Riffaud, J., Cornu, D., y Capelli, P. (1981). Utilisation de la culture in vitro pour la multiplication de merisiers adultes (*Prunus avium* L.) sélectionnés en forêt (*). *Agronomie*. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00884305>
- Robert, M., Herrera-Herrera, J., Herrera-Herrera, G., Herrera, M. y Fuentes, P. (2006). A New Temporary Immersion Bioreactor System for Micropropagation. *Methods in molecular biology*. Human Press. 2da. Ed.121-130

- Roca, W. y Mroginski, L. (Ed.). (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Cali, Colombia (pp. 30-33). CIAT
- Rodrigo, J., Macarulla, B. y Escartín, J. (2016). Unidad de Hortofruticultura, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA). Revista de Fruticultura- N° 47,18-25. <https://www.researchgate.net/publication/301228329>
- Rodríguez, R. y Pérez, M. (2019). Factores que afectan la formación de pigmentos en sistemas de inmersión temporal. Revista de Agricultura Tropical, 40(2), 15–24
- Rodríguez, R., García, D. y Pérez, M. (2006). Efecto de la frecuencia de inmersión en la producción de clorofila de plántulas in vitro. Acta Botánica Cubana, 23, 101–109
- Segretín, M. (2020). Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). ArgenBio. INGEBI-CONICET - Dpto. FBMyc, FCEyN-UBA
- Sharry, S., Adema, M. y Abedini, W. (2015). Plantas de probeta: manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro. Edulp.
- Singh, S., Sundouri, M., Sharma, M., Srivastava, K. y Dar, H. (2010). Proliferation and rooting efficiency studies in sour cherry (*Prunus cerasus*) using in vitro techniques. Journal of Horticultural Sciences, 5(1): 48-52.
- Smartcherry. (2024). Chile exportó 413.979 toneladas de cerezas durante la Tp. 2023-2024.<https://smartcherry.cl/comercial/chile-exporto-413-979-toneladas-de-cerezas-durante-la-tp-2023-2024/>
- Subercaseaux, J. (2019). El cultivo rentable del cerezo. Redagricola, (2), p-40.
- Tacchini, F. (2015). Producción y Comercialización de Cereza en Mendoza, Argentina. Fundación Instituto de Desarrollo Rural <https://www.idr.org.ar/wp-content/uploads/2015/07/Manual-de-Producci%C3%B3n-y-Comercializaci%C3%B3n-de-Cerezas-Mendoza-part-1.pdf>
- Vidal, N. y Sánchez, C. (2019). Use of bioreactor systems in the propagation of forest trees. Engineering in life Sciences. Vol.19: 896-915. <https://doi.org/10.1002/elsc.201900041>
- Vinelli, M. (2017). La cereza: una nueva oportunidad para el negocio agroexportador. (Esan).

Watt, M. (2012). The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. *African Journal of Biotechnology*, 11(74): 14025-14035.

VIII. ANEXOS

Anexo 1:

Medio de cultivo semisólido

MEDIO SEMISÓLIDO	
COMPONENTES	gr/l
DKW	5.32
BAP	0.0008
IBA	0.00001
Azúcar	30
Agar	7
Ppm	1 ml/l
pH	6

Nota: El medio semisólido utilizado se formuló con sales DKW, reguladores de crecimiento (BAP e IBA), azúcar, agar y PPM, ajustado a pH 6, adecuado para el establecimiento y crecimiento in vitro.

Anexo 2:

Medio de cultivo líquido (testigo) en SIT.

MEDIO LÍQUIDO	
COMPONENTES	gr/l
DKW	5.32
BAP	0.0008
IBA	0.00001
AZÚCAR	30
Ppm	1 ml/l
Ph	6

Nota: Fuente: Godoy et al., (2017); el tiempo y frecuencia de inmersión serán de 3 min cada 8 h.

Anexo 3:*Evaluación morfológica de los brotes por cada tratamiento*

Tratamientos	Calificación
TC	4
T0	3
T1	1
T2	3
T3	4
T4	3
T5	5
T6	5
T7	5
T8	4
T9	3
T10	3
T11	4
T12	1
T13	1
T14	2
T15	4
T16	3

Nota: La evaluación morfológica evidenció variabilidad en la calidad de los brotes según el tratamiento, destacando T5, T6 y T7 con calificaciones altas, lo que indica un mejor desarrollo y vigor



TC (m. semisólido): vigor medio



T0 (Testigo): poco vigor



T1: Muy vitrificado



T2: poco vigor



T3: vigor medio



T4: poco vigor



T5: Excelente vigor



T6: Excelente vigor



T7: Excelente vigor



T8: Vigor medio



T9: poco vigor



T10: poco vigor



T11: vigor medio



T12: Muy vitrificado



Nota: Las imágenes muestran la respuesta morfológica de los brotes según tratamiento. evidenciando diferencias en calidad y desarrollo.

Anexo 4:

Registros de datos de todas las variables dependientes

TASA DE MULTIPLICACIÓN			
TRATAMIENTOS	REPETICIONES	NºBROTOS FINAL	PROMEDIO
T1	T1.1	113	3.2
	T1.2	108	
	T1.3	109	
T2	T2.1	72	1.81
	T2.2	78	
	T2.3	76	
T3	T3.1	89	2.28
	T3.2	88	
	T3.4	84	
T4	T4.1	88	2.41
	T4.2	98	
	T4.3	85	
T5	T5.1	83	2.27
	T5.2	94	
	T5.3	83	
T6	T6.1	107	3.31
	T6.2	120	
	T6.3	111	
T7	T7.1	149	4.48
	T7.2	135	
	T7.3	142	
T8	T8.1	109	3.2
	T8.2	112	
	T8.3	109	
T9	T9.1	91	2.57
	T9.2	95	
	T9.3	97	
T10	T10.1	94	2.57
	T10.2	96	
	T10.3	93	
T11	T11.1	139	2.87
	T11.2	72	

	T11.3	94	
	T12.1	82	
T12	T12.2	87	2.19
	T12.3	85	
	T13.1	82	
T13	T13.2	92	2.25
	T13.3	85	
	T14.1	88	
T14	T14.2	87	2.29
	T14.3	87	
	T15.1	94	
T15	T15.2	78	2.25
	T15.3	87	
	T16.1	93	
T16	T16.2	103	2.73
	T16.3	99	
	T0.1	88	
T0	T0.2	76	2.04
	T0.3	79	
	convencional 1.1	39	
TC	convencional 1.2	42	0.41
	convencional 1.3	40	

Nota: Presentación de los datos de tasa de multiplicación por tratamiento. Se observaron diferencias en el número de brotes, destacando el T7 con el mayor promedio (4.48), frente al control convencional con la tasa más baja (0.41).

LONGITUD DE BROTES			
TRATAMIENTOS	REPETICIONES	Lb(cm)	PROMEDIO
TC	convencional 1.1	2.67	2.57
	convencional 1.2	2.64	
	convencional 1.3	2.4	
T0	T0.1	2.05	2.01
	T0.2	2	
	T0.3	1.98	
T1	T1.1	2.03	1.91
	T1.2	1.81	
	T1.3	1.9	
T2	T2.1	3.19	3.02
	T2.2	2.95	
	T2.3	2.92	
T3	T3.1	1.26	1.38
	T3.2	1.72	
	T3.4	1.15	
T4	T4.1	2	1.95
	T4.2	1.36	
	T4.3	2.49	
T5	T5.1	3.4	3.17
	T5.2	3.14	
	T5.3	2.98	
T6	T6.1	2.05	2.15
	T6.2	2.4	
	T6.3	2	
T7	T7.1	2.82	2.8
	T7.2	2.9	
	T7.3	2.78	
T8	T8.1	2.19	2.2
	T8.2	2.4	
	T8.3	2.11	
T9	T9.1	3.24	3.17
	T9.2	3.62	
	T9.3	2.65	
T10	T10.1	3.43	3.36
	T10.2	3.21	
	T10.3	3.45	
T11	T11.1	3.42	3.48
	T11.2	3.49	
	T11.3	3.52	

T12	T12.1	1.93	
	T12.2	2.13	1.93
	T12.3	1.73	
T13	T13.1	3.57	
	T13.2	3.7	3.64
	T13.3	3.66	
T14	T14.1	2.13	
	T14.2	1.72	1.83
	T14.3	1.65	
T15	T15.1	1.94	
	T15.2	2.12	1.93
	T15.3	1.74	
T16	T16.1	2	
	T16.2	2.05	2.01
	T16.3	1.99	

Nota: La longitud de brotes varió entre tratamientos, destacando T13 (3.64 cm) y T11 (3.48 cm) con los mayores promedios, en contraste con T3 y T14, que presentaron brotes más cortos.

AREA FOLIAR			
TRATAMIENTOS	REPETICIONES	(CM^2)	PROMEDIO POR TRATAMIENTO
TC	convencional 1.1	0.2	0.6
	convencional 1.2	0.8	
	convencional 1.3	0.9	
T0	T0.1	0.9	0.8
	T0.2	0.8	
	T0.3	0.8	
T1	T1.1	0.4	0.4
	T1.2	0.4	
	T1.3	0.4	
T2	T2.1	0.7	0.8
	T2.2	0.9	
	T2.3	0.8	
T3	T3.1	0.7	0.6
	T3.2	0.5	
	T3.3	0.6	
T4	T4.1	0.4	0.4
	T4.2	0.6	
	T4.3	0.4	
T5	T5.1	0.6	0.5
	T5.2	0.3	
	T5.3	0.7	
T6	T6.1	0.7	0.6
	T6.2	0.5	
	T6.3	0.7	
T7	T7.1	1.0	1.0
	T7.2	1.1	
	T7.3	0.9	
T8	T8.1	0.6	0.6
	T8.2	0.6	
	T8.3	0.6	
T9	T9.1	0.7	0.6
	T9.2	0.8	
	T9.3	0.4	
T10	T10.1	0.5	0.5
	T10.2	0.5	
	T10.3	0.5	
T11	T11.1	0.4	0.5

	T11.2	0.6	
	T11.3	0.5	
	T12.1	0.5	
T12	T12.2	0.4	0.4
	T12.3	0.4	
	T13.1	1.2	
T13	T13.2	1.3	1.2
	T13.3	1.2	
	T14.1	0.4	
T14	T14.2	0.4	0.4
	T14.3	0.4	
	T15.1	0.6	
T15	T15.2	0.6	0.6
	T15.3	0.6	
	T16.1	0.6	
T16	T16.2	0.6	0.6
	T16.3	0.5	

Nota: El área foliar presentó variaciones entre tratamientos, sobresaliendo T13 (1.2 cm²) y T7 (1.0 cm²) como los de mayor desarrollo foliar, mientras que tratamientos como T1, T4 y T14 mostraron los valores más bajos.

CONCENTRACIONES DE CLOROFILA

TRATAMIENTOS	REPETICIONES	CLOROFILA (mg/g.m.s)			PROMEDIO
		A	B	TOTAL	
TC	convencional 1.1	14.1	4.1	18.2	18.63
	convencional 1.2	14.5	4.7	19.2	
	convencional 1.3	14.3	4.2	18.5	
T0	T0.1	6.5	2.2	8.7	8.63
	T0.2	6.4	2.1	8.5	
	T0.3	6.5	2.2	8.7	
T1	T1.1	10.6	3.4	14	12.23
	T1.2	8.8	2.7	11.5	
	T1.3	8.6	2.6	11.2	
T2	T2.1	11.2	3.9	15.1	14.80
	T2.2	11.1	3.8	14.9	
	T2.3	10.7	3.7	14.4	
T3	T3.1	12.8	4.3	17.1	16.87
	T3.2	12.7	4.3	17	
	T3.3	12.5	4	16.5	
T4	T4.1	11.5	2.7	14.2	14.07
	T4.2	11.4	2.6	14	
	T4.3	11.4	2.6	14	
T5	T5.1	14	4.3	18.3	18.33
	T5.2	14.2	4.2	18.4	
	T5.3	14.1	4.2	18.3	
T6	T6.1	16.1	4.9	21	20.93
	T6.2	16	4.9	20.9	
	T6.3	16.1	4.8	20.9	
T7	T7.1	15.3	4.8	20.1	19.83
	T7.2	15	4.7	19.7	
	T7.3	15.1	4.6	19.7	
T8	T8.1	14.7	4.5	19.2	18.6
	T8.2	14	4.1	18.1	
	T8.3	14.2	4.3	18.5	
T9	T9.1	10	3.2	13.2	13.83
	T9.2	11	3.5	14.5	
	T9.3	10.5	3.3	13.8	
T10	T10.1	15.1	4.5	19.6	19.63
	T10.2	15.1	4.6	19.7	
	T10.3	15.1	4.5	19.6	
T11	T11.1	11.7	4.2	15.9	15.83

	T11.2	11.4	4.3	15.7	
	T11.3	11.6	4.3	15.9	
T12	T12.1	7.3	2.2	9.5	9.43
	T12.2	7.3	2.1	9.4	
	T12.3	7.2	2.2	9.4	
T13	T13.1	6.5	2.2	8.7	8.7
	T13.2	6.6	2.3	8.9	
	T13.3	6.4	2.1	8.5	
T14	T14.1	9.7	3.2	12.9	12.8
	T14.2	9.6	3.1	12.7	
	T14.3	9.7	3.2	12.9	
T15	T15.1	14.5	4.7	19.2	19
	T15.2	14.4	4.6	19	
	T15.3	14.3	4.5	18.8	
T16	T16.1	11.5	3.7	15.2	14.77
	T16.2	11.4	3.6	15	
	T16.3	11	3.1	14.1	

Nota: Los tratamientos T6, T7 y T10 presentaron las concentraciones más altas de clorofila total, superando los 19 mg/g.m.s., lo que indica mayor actividad fotosintética en comparación con otros tratamientos.

Anexo 5.

Matriz de consistencia

TÍTULO	Micropropagación masiva de portainjerto comercial de cerezo (<i>Prunus</i> sp.) en un sistema de inmersión temporal
PROBLEMA	¿Cuál es la relación de Ácido Indol-3-Butírico (IBA): 0.1, 0.5 mg/l y Bencilaminopurina-6 (BAP): 0.5, 1 mg/l, además del tiempo: 4 y 6 min, y frecuencia de inmersión: 12 y 24 h; que producirá la mayor tasa de multiplicación, longitud de brotes, área foliar y concentración de clorofila; para el portainjerto <i>Prunus</i> sp. en un sistema de inmersión temporal?
HIPÓTESIS	La relación de Ácido Indol-3-Butírico (IBA) 0.5 mg/l y Bencilaminopurina-6 (BAP) 1 mg/l para el portainjerto <i>Prunus</i> sp. producirá una mayor tasa de multiplicación, longitud de brotes, área foliar y concentración de clorofila; en un sistema de inmersión temporal con tiempo y frecuencia de inmersión de 4 min y 12 h respectivamente.
VARIABLES	Variables independientes: - Concentraciones de Ácido Indol-3-Butírico (IBA): 0.1 y 0.5 mg/l - Concentraciones de Bencilaminopurina-6 (BAP): 0.5 y 1 mg/l - Tiempo de inmersión: 4 min. y 6 min. - Frecuencia de inmersión: 12 h y 24 h. Variables dependientes: - Tasa de multiplicación (Tm): n° brotes - Longitud de brote (Lb): cm - Área foliar (Af): cm² - Concentración de clorofila (Cc): mg/g.m.s

OBJETIVOS	Objetivo General - Micropropagar masivamente portainjerto comercial de cerezo (<i>Prunus</i> sp.) en un sistema de inmersión temporal (SIT). Objetivos específicos - Optimizar el tiempo y frecuencia de inmersión que estarán expuestos los explantes en el sistema de inmersión temporal. - Determinar las concentraciones óptimas del Ácido Indol-3-Butirico (IBA) y Bencilaminopurina-6 (BAP). - Calcular la tasa de multiplicación. - Evaluar el área foliar. - Evaluar la longitud de brotes. - Medir la concentración de clorofila de las hojas producidas en sistema de inmersión temporal.
DISEÑO EXPERIMENTAL	El siguiente estudio empleará un diseño experimental factorial 2^4, con cuatro variables independientes (Concentraciones de IBA, concentración de BAP, Tiempo y la frecuencia de inmersión) y con dos niveles cada una; estableciéndose un total de 16 experimentos; con 3 réplicas cada tratamiento más el testigo, sumando un total de 51 experimentos. En cada tratamiento se emplearán 30 explantes como material inicial.
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	Se realizará un análisis de varianza (ANOVA) con los resultados obtenidos, con un nivel de significancia del 5% ($p < 0.05$) y un intervalo de confianza del 95%. Además, se aplicó la prueba de rango TUKEY para identificar las diferencias significativas entre los tratamientos y determinar el óptimo, empleando el software PYTHON versión 11.
TIPO DE INVESTIGACIÓN	Por su propósito: Aplicada Por su naturaleza: Experimental

	Unidad de Análisis: Biorreactor plantform con explantes de <i>Prunus</i> sp. bajo condiciones específicas para la multiplicación <i>in vitro</i>. Muestra: 1530 brotes de <i>Prunus</i> sp; los cuales se emplearon en los tratamientos en biorreactores PLANTFORM Técnicas e instrumentos: Análisis Bibliográfico - Fichas Bibliográficas
--	--

Anexo 6: Operacionalización de las variables

Variables	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensiones	Indicadores	Escala de medición
Variable dependiente:	1. Número de brotes generados por explante en un periodo determinado.	1. Conteo del número de brotes por explante al final del periodo de evaluación.	1. Brotes por explante	1. (N.º de brotes finales - N.º de brotes iniciales) / tiempo	De razón
1. Tasa de multiplicación TM	2. Tamaño del brote desde la base hasta el ápice.	2. Medición con regla milimétrica al finalizar el experimento.	2. Crecimiento vegetativo	2. Longitud en cm	De razón
2. Longitud de brote (Lb)	3. Tamaño de la lámina foliar desarrollada en cada brote.	3. Medición del largo y ancho de hojas desarrolladas con regla milimétrica.	3. Desarrollo foliar	3. Longitud en cm ²	De razón
3. Longitud de hoja (Lh)	4. Cantidad de pigmentos fotosintéticos presentes en las hojas, esenciales para la fotosíntesis.	4. lectura de absorbancia por el espectrofotómetro a longitudes de onda de 663.6 nm y 646.6 nm para clorofila a y b	4. Contenido de clorofila a, b y total	4. Concentración en mg/g .m.s	De razón
4. Concentración de clorofila (Cc)					