



**UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA**

Multiplicación *in vitro* de *Aristotelia chilensis* en sistema de inmersión temporal SETIS

MEMORIA DE TÍTULO

Martin Esteban Navarrete Yáñez

**TALCA- CHILE
1^{er} Semestre del 2019**



**UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA**

**Multiplicación *in vitro* de *Aristolélica chilensis* en sistema de inmersión temporal
SETIS**

**Por
Martin Esteban Navarrete Yáñez**

MEMORIA DE TITULO

**Presentada a la
Universidad de Talca como
Parte de los requisitos para optar al título de**

INGENIERO AGRÓNOMO

TALCA, 1^{er} Semestre del 2019

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2019



Profesor guía:

Ing. Agrónomo, Dra. Hermine Vogel
Decana de la Facultad de Ciencias Agrarias
Universidad de Talca



Profesor Co-Guía:

Ing. Agrónomo, Dra. Valeria Muñoz
Profesora de la Escuela de Agronomía
Universidad de Talca

Fecha de presentación memoria de título: 9 de mayo del 2019

Resumen

El creciente interés mundial por la demanda de frutos silvestres tales como el maqui (*Aristotelia chilensis*), han generado la necesidad por cultivar esta especie de forma comercial gracias a su alto contenido antioxidante. Clones seleccionados pueden ser propagados vegetativamente y de forma masiva mediante la micropropagación. Sin embargo, el uso de agentes gelificantes y el elevado número de operaciones manuales en el cultivo *in vitro* conlleva elevados, costos de producción. El presente estudio pretende excluir el gelificante en los medios de cultivo y contrastar el cultivo *in vitro* de maqui de la variedad "Luna Nueva" en medio solido con un sistema de inmersión temporal (SIT) específicamente en SETIS. En los explantes de los clones se evaluó el tiempo (1 y 2 min) y la frecuencia (6, 8,10,12 y 24 horas) de inmersión en medio líquido en un diseño experimental de cuatro tratamientos con 16 repeticiones. Al cabo de cuatro y seis semanas se evaluó el número de brotes, numero de nudos, longitud de brote, peso del brote, peso del explante y porcentaje de hiperhidricidad. Con el empleo del SETIS los mejores resultados se obtuvieron con una inmersión cada 12 horas durante un minuto, con explantes de mayor desarrollo y menor desorden fisiológico, en comparación entre el medio sólido y el medio líquido. Por lo que se concluye que el cultivo de maqui variedad "Luna Nueva" en la etapa de la multiplicación en SETIS, favorece crecimiento y la proliferación de nuevos brotes.

Palabras clave: Maqui, variedad 'Luna Nueva', micropropagacion, sistemas de inmersión temporal, SETIS, hiperhidricidad.

Abstract

The growing worldwide interest in the demand for wild fruits such as the maqui (*Aristotelia chilensis*), has generated the need to grow this species commercially thanks to its high antioxidant content. Selected clones can be propagated vegetatively and massively by micropropagation. However, the use of gelling agents and the high number of manual operations in the in vitro culture entails high production costs. The present study aims to exclude the gelling agent in the culture media and contrast the in vitro culture of maqui of the variety "Luna Nueva" in solid medium with a temporary immersion system (SIT) specifically in SETIS. In the explants of the clones, the time (1 and 2 min) and the frequency (6, 8, 10, 12 and 24 hours) of immersion in liquid medium were evaluated in an experimental design of four treatments with 16 repetitions. After four and six weeks the number of shoots, number of nodes, shoot length, weight of the shoot, weight of the explant and percentage of hyperhydricity were evaluated. With the use of SETIS the best results were obtained with one immersion every 12 hours for one minute, with explants of greater development and less physiological disorder, in comparison between the solid medium and the liquid medium. So it is concluded that the cultivation of maqui variety "New Moon" in the stage of multiplication in SETIS, favors growth and the proliferation of new outbreaks.

Keywords: Maqui, variety "Luna Nueva", micropropagation, temporary immersion systems, SETIS, hyperhydricity.

INDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	13
1.1. Hipótesis.....	14
1.2. Objetivo General.....	14
1.3. Objetivo Específico.....	14
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. Descripción botánica.....	15
2.2. Distribución geográfica	15
2.3. Antecedentes comerciales.....	15
2.4. Características y cualidades del maqui	15
2.5. Variedades desarrolladas.....	16
2.6. Propagación de la especie.....	16
2.7. Propagación vegetativa.....	16
2.8. Propagación <i>in vitro</i>	17
2.9. Medios de cultivo.....	19
2.10. Desordenes fisiológicos asociados al cultivo <i>in vitro</i>	19
2.11. Bioreactor en la biotecnología.....	20
2.12. Sistemas de inmersión temporal (SIT)	20
2.13. SIT SETIS	22
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1. Lugar de trabajo	23
3.2. Material Vegetal.....	23
3.3. Material de laboratorio.....	23
3.4. Reactivos	23
3.5. Herramientas para el proceso:	23
3.6. Obtención de plantas a través de cultivo <i>in vitro</i>	24
3.7. Esterilización de instrumentos y herramientas	24
3.8. Sistema de inmersión temporal (SETIS).....	24
3.9. Preparación del Medio de cultivo.....	25
3.10. Dispensar medio nutritivo en frascos y SETIS	25

3.11.	Introducción de los explantes	25
3.12.	Condiciones físicas en la cámara de cultivo	25
3.13.	Disposición del ensayo	26
3.14.	Primer ensayo: Efectos de la frecuencia de inmersión ≥ 12 h y tiempos.	26
3.15.	Segundo ensayo: Efectos de la frecuencia de inmersión ≤ 12 h.	27
3.16.	Diseño experimental	28
3.17.	Criterios de evaluación	28
3.18.	Análisis de resultados.	28
4.	RESULTADOS	29
4.1.	Primer ensayo: Efectos de la frecuencia de inmersión ≥ 12 h y tiempos.	29
4.1.2.	Largo de brote (cm)	29
4.1.3.	Número de nudos	29
4.1.4.	Número de brotes por explante	30
4.2.	Segundo ensayo: Efectos de la frecuencia de inmersión ≤ 12 h.	31
4.2.1.	Peso final del explante	31
4.2.2.	Peso final del brote	31
4.2.3.	Largo del brote	32
4.2.4.	Número de nudos por brote	33
4.2.5.	Número de brotes nuevos	33
4.2.6.	Hiperhidricidad	34
4.3.	Producción de plantas en SETIS v/s in vitro	35
5.	DISCUSIÓN	36
6.	CONCLUSIÓN	38
7.	BIBLIOGRAFÍA	39
7.1	Glosario	46

Índice de figuras

Figura 1 valvulas, programador y SETIS.	23
Figura 2 Esquema del mecanismo de acción del sistema SETIS (Vervit 2013). Fase 1: Fase estacionaria; Fase 2: Fase inmersión; Fase 3: Fase finalización de la inmersión; Fase 4: Fase ventilación.	24
Figura 3 Representación esquemática de la distribución de los SETIS en la repisa.	26
Figura 4 Largo de brotes.....	29
Figura 5 Número de nudos por brote.....	30
Figura 6 Número de brotes.	30
Figura 7 Peso final explante.	31
Figura 8 Peso final del Brote.....	32
Figura 9 Largo de brote.....	32
Figura 10 N° de nudos	33
Figura 11 N° de brotes nuevos.	34

Índice de cuadros

Cuadro 1 Frecuencia y tiempo de inmersión por cada tratamiento.	27
Cuadro 2 Frecuencia y tiempo de inmersión por cada tratamiento.	27
Cuadro 3 Mediciones realizadas para calcular los costos de producción en cada etapa para la producción de plantas en cultivo <i>in vitro</i> vs SETIS.	¡Error! Marcador no definido.

Índice de tablas

Tabla 1 Hiperhidricidad (%) en los respectivos tratamientos.....	34
Tabla 2 Comparación entre cultivo <i>in vitro</i> tradicional v/s SETIS, en multiplicación de explantes por nudos.....	35

1. INTRODUCCIÓN

El maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz), es una especie endémica, nativa dentro del territorio chileno y el argentino en la zona centro sur, cercano al sector precordillerano y los valles centrales (latitudes 30-46° S) respectivamente y hasta los 2500 msnm. Perteneciente a la familia Elaeocarpaceae, es una especie dioica que generalmente se puede encontrar de forma silvestre como un árbol o un arbusto siempre verde (Rodríguez *et al.*, 1983).

La importancia de esta especie radica en las múltiples propiedades medicinales que benefician a la salud humana. Según señalan Avello *et al.*, (2009) y Rojo *et al.*, (2012) el maqui tiene efectos anti-diabéticos y anti-bacterianos, con un impacto positivo en la bioquímica y fisiología humana. Además, es una especie que contiene mayores concentraciones presentes en sus frutos que los berries más comunes como el arándano (Reyes-Farías *et al.*, 2014).

Debido a la creciente demanda de esta especie, se debe generar de forma creciente y sostenida la propagación masiva de plantas de maqui. Para satisfacer las necesidades del mercado se ha iniciado la reproducción en condiciones de laboratorio bajo cultivo *in vitro*, debido a que ofrece una productividad sostenida durante el año. En la actualidad la tecnología sigue avanzando en la propagación masiva de plantas y hoy se dispone de un nuevo sistema de reproducción de explantes más rápido y eficiente, conocido como Sistema de Inmersión Temporal (SIT). La efectividad de este sistema radica en que se reduce la manipulación y por ende la probabilidad de contaminación del material, se genera un sistema de mayor autonomía y se puede mantener una alta reproducción de plantas en espacios reducidos (Etienne y Berthouly 2002). Su uso ha permitido alcanzar grandes niveles de proliferación durante la etapa de multiplicación en varias especies como caña de azúcar, bananos, guayabos (Lorenzo *et al.*, 1998; Aragón *et al.*, 2005; Castro y González Olmedo, 2005; Molina *et al.*, 2005).

En este contexto se analiza el comportamiento de explantes de maqui de la variedad Luna Nueva en un sistema de inmersión temporal llamado SETIS. Este biorreactor ofrece independencia frente al sistema convencional de micropropagación, además cuenta con ventilación que genera beneficios para el desarrollo de los cultivos de forma segura mediante filtros moduladores incorporados. Sin embargo, es fundamental determinar la frecuencia y el tiempo de inmersión óptimos para cada especie y variedad, para favorecer el desarrollo de la misma según sus demandas fisiológicas. Del ajuste del tiempo de inmersión depende en gran medida la eficiencia del empleo de los Sistemas de Inmersión Temporal (Escalona, 2006; Berthouly y Etienne, 2005).

1.1 Hipótesis

- La multiplicación de explantes de maqui es más eficiente en un sistema de inmersión temporal que en el cultivo *in vitro* en medio sólido.

1.2 Objetivo General

- Establecer los factores metodológicos en el sistema de inmersión temporal en maqui.

1.3. Objetivo Específico

- Establecer el sistema SETIS en el laboratorio de cultivo *in vitro*.
- Comparar las ventajas de micropropagación de maqui en un medio líquido vs un medio sólido.
- Determinar los efectos de la frecuencia y el tiempo de inmersión sobre el desarrollo de los explantes de maqui de la variedad Luna Nueva en medio líquido.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Descripción botánica

El maqui (*Aristotelia chilensis* Molina Stuntz) también se reconoce como Koleón, Maquei y Queldrón (Hoffmann, 1987). Es un árbol pequeño perteneciente a la familia Eleocarpaceae. Esta familia posee 10 géneros y alrededor de 400 especies en el mundo, que se distribuyen en regiones tropicales y templadas (con excepción del continente africano). El género *Aristotelia* está representado por cinco especies, distribuidas en las zonas templadas del Pacífico Sur, encontrándose en Chile, Argentina, Nueva Zelandia, Australia e Isla Tasmania (Silva *et al.*, 1995; Hoffmann 1987).

El fruto del maqui es una baya redonda comestible de color negro brillante, de unos 5 mm de diámetro, de pulpa dulce en cuyo interior hay dos a cuatro semillas angulosas de 3 mm de largo y 2 mm de ancho (Hoffmann 1987; Oyanadel 2002).

2.2 Distribución geográfica

El maqui es una planta que crece en Chile desde la región de Coquimbo hasta la región de Aysén, en los sectores de valles y precordillera, formando poblaciones conocidas por la comunidad como “macales” (Rodríguez *et al.*, 1983).

2.3 Antecedentes comerciales

Debido a la creciente demanda del maqui por sus beneficios a la salud, sus frutos están siendo extraídos de forma silvestre. Vogel *et al.* (2014) señalan que la explotación y cosecha de las comunidades en el ecosistema tiene un impacto negativo que genera a largo plazo erosión genética, por lo que el desarrollo de variedades domesticadas es inminente para establecer huertos comerciales, con el fin de satisfacer la demanda actual y futura.

Se proyecta un alza sostenida del maqui procesado por la demanda mundial que supera los 18000 kilos y cuyo monto asciende hasta 4,5 millones USD, Odepa (2015). Esto implica un nicho de mercado que aún no se ha satisfecho, siendo un buen indicador para los inversionistas.

2.4 Características y cualidades del maqui

El maqui es conocido por sus múltiples propiedades. Recientemente, la atención se ha concentrado en el estudio científico de los polifenoles y especialmente las antocianinas presentes en maqui y otros berries con un potencial que beneficia a la salud humana, pudiendo ser usado como un suplemento alimenticio (Du *et al.*, 2004).

Estos beneficios son atribuidos a un alto contenido de polifenoles, y una amplia variedad de antocianinas y flavonoides (Fredes *et al.*, 2012). El fruto del maqui contiene altos

niveles de antocianinas derivados de delphinidina, malvidina, pentunidina, cyanindin, peonidin (Cespedes *et al.*, 2010; Brauch *et al.*, 2016; Escribano-Bailon *et al.*, 2006; Fredes *et al.*, 2014a y 2014b). Debido a que estos metabolitos secundarios se encuentran presentes en los frutos y hojas, estos son los responsables de sus propiedades medicinales según lo indica Schrickel y Bittner (2001). La farmacología contempla las partes aéreas de la planta, hojas y frutos del maqui, encontrándose propiedades anti-inflamatorias, analgésica, antioxidante, antidiabética, antiviral, actividad antimicrobiana, antimutagenicas, antiescleróticas, antihiperoglucemiantes, antitumorales (Delporte 2007; Rojo *et al.*, 2012; Touati *et al.*, 2015).

2.5 Variedades desarrolladas

La Universidad de Talca ha seleccionado plantas de *A. chilensis* de alto rendimiento frutal y buena calidad de fruta de poblaciones silvestres distribuidas en Chile entre las latitudes 34 y 41 ° S. Varias selecciones y procedencias en diferentes condiciones ambientales para seleccionar los genotipos más adecuados para el establecimiento de huertos comerciales (Vogel *et al.*, 2016).

Los resultados obtenidos durante la segunda y tercera temporada de crecimiento indican que las selecciones 'Luna Nueva' y 'Morena' comienzan la producción de fruta un año antes en Chile central que en el sur de Chile. 'Luna Nueva' es un arbusto pequeño y compacto con una carga de fruta temprana y muy alta. Sus bayas tienen un alto contenido de polifenoles, están firmemente adheridas y no se caen al madurar (Vogel *et al.*, 2016).

Brauch *et al.* (2017), indican que dos de estas variedades de maqui llamadas "Luna Nueva" y "Morena" mostraron una alta concentración de delphinidina 3-O-(2"-O- β -xylopyranosyl- β -glucopyranoside)-5-O- β -glucopyranoside y delphinidina 3-O- β -glucopyranoside-5-O- β -glucopyranoside respectivamente.

2.6 Propagación de la especie

El maqui es una especie dioica que depende de la fecundación cruzada para su propagación (Rodriguez *et al.* 1983). Al ser además una especie que en la naturaleza se propaga fácilmente vía semilla, se mantiene una gran variabilidad genética en sus poblaciones naturales (Vogel *et al.*, 2005).

2.7 Propagación vegetativa

La propagación vegetativa es una forma de multiplicar la especie, en la cual no interviene los órganos sexuales para formar un nuevo individuo (Ottone 1993). Esta técnica permite utilizar un segmento de la planta madre. El segmento o parte vegetativa apropiada para la propagación, se coloca inmediatamente después de extraída en condiciones

favorables para dar lugar a una nueva planta, la cual tendrá los mismos caracteres de la madre (Schaerer 1951). La selección del material vegetal está orientada a elegir individuos con características como varas derechas y vigorosas, sin indicios de daños por insectos o enfermedades y sin estrés hídrico (Ottone, 1993).

Existen dos características fundamentales de las células vegetales que permiten la propagación vegetativa. Una es la desdiferenciación, que consiste en la capacidad de las células maduras de volver a una condición meristemática y desarrollar un punto de crecimiento nuevo y la segunda es la totipotencia, que hace referencia a que cada célula vegetal contiene la información genética necesaria para reconstruir todas las partes de la planta y sus funciones (Hartmann *et al.* 1990).

2.8 Propagación *in vitro*

Desde comienzos del siglo XX se realizaron los primeros ensayos de cultivo *in vitro*. Haberlandt (1902) utilizó por primera vez medio líquido para cultivar células aisladas de brácteas de *Lamium purpureum* en solución de Knop suplementada con sacarosa (Preil 2005). Las células vivieron por más de un mes, pero no se dividieron. Sesenta años más tarde, Kohlenbach (1959) observó que las células mesófilas diferenciadas de *Macleaya cordata* se desarrollan en grupos de células y órganos formadores de callos y embriones somáticos. Cada célula es autónoma y puede generar una nueva planta dándole las condiciones especiales (Pierik, 1987).

Durante las últimas décadas la propagación *in vitro*, organogénesis y embriogénesis somática se han transformado en una alternativa para propagar diversas especies (Hartmann *et al.* 2002). Algunas de las especies con gran importancia económica alrededor del mundo que son propagadas por explantes son por ejemplo el guayabo (*Psidium guajava* L.) (Vilchez y Albany, 2014), el banano (*Mussa* spp.) (Aragón *et al.*,2005) y la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) (Posada *et al.* 2003).

La micropropagación fue definida por Murashige (1974) que se centró en tres grandes etapas en el proceso: la etapa I cumple con el objetivo de generar el cultivo de un explante aséptico de la especie seleccionada; la etapa II tiene el fin de la multiplicación del propágulo; y finalmente la etapa III consiste en la aclimatación de las plantas en el suelo mediante el enraizamiento de los explantes, el endurecimiento de las plantas, lo que permite la transición de un estado heterótrofo a un estado autótrofo.

Actualmente para una micropropagación exitosa se consideran cinco etapas para un cultivo *in vitro* (García-Gonzales *et al.*,2010).

Etapa 0: Principalmente está enfocada en la preparación de las plantas madre para que puedan proveer explantes de calidad, aptos para las condiciones *in vitro*. En esta etapa

es crucial el estado sanitario, nutricional e hídrico de las plantas madre, ya que influye notablemente en el éxito del establecimiento del material vegetal (Hussain *et al.*, 2012).

Etapa I: En este momento se inicia el cultivo *in vitro*. Se denomina como la etapa de introducción y establecimiento de los explantes. Esta enfoca el manejo, selección y esterilización de los explantes, siendo este último factor uno de los más influyentes en el éxito de la micropropagación, debido a que un gran porcentaje de pérdidas en esta etapa se deben a la contaminación microbiana. Diferentes métodos de esterilización son utilizados de acuerdo al tipo y tamaño del explante, así como la especie con la cual se trabaja, tratando de minimizar el daño al tejido a introducir (Iliev *et al.*, 2010).

Etapa II: Esta etapa corresponde a la multiplicación, variando según el método de multiplicación seleccionado; las más frecuentes son a través de callos, formación de yemas adventicias o aumento de la ramificación lateral. La propagación a través de callos es el método más rápido de multiplicación, pero también es el más inestable genéticamente. La multiplicación por ramificación lateral, a pesar de ser la más lenta al comienzo, puede alcanzar grandes producciones en un tiempo determinado, además de presentar una baja susceptibilidad a cambios genotípicos durante la micropropagación (Bhojwani y Razdan, 1996). La eficacia de la tasa de multiplicación depende de diversos factores, tales como el genotipo, la composición del medio, las condiciones ambientales generadas en el espacio *in vitro*, entre otras señalan Dobránszki y da Silva (2010).

Etapa III: Esta etapa comprende al enraizamiento del explante, donde se forman las raíces que le entregan absorción de nutrientes y sostén para prepararlo al traspaso *ex vitro*. El enraizamiento de los explantes puede llevarse a cabo tanto *in vitro* como en condiciones controladas en invernadero o *ex vitro* (Hartmann *et al.*, 1997).

Etapa IV: Finalmente esta etapa se conoce como adaptación *ex vitro* o aclimatización, la cual consiste en una transición gradual de las plantas del ambiente *in vitro* a las condiciones *ex vitro*. Las diferencias entre las condiciones *in vitro* y *ex vitro* se relacionan principalmente al porcentaje de humedad y la radiación entre ambos sistemas, las altas concentraciones de reguladores de crecimiento a que están expuestas las plántulas *in vitro* y el modo heterotrófico de nutrición que les permite su sobrevivencia (Pospíšilová *et al.*, 1999).

2.9 Medios de cultivo

El medio de cultivo es el medio nutritivo en el cual se desarrolla el cultivo de tejidos y el éxito de la micropropagación depende en gran medida de la preparación y formulación de éstos. Los medios conformados esencialmente por los siguientes compuestos: sales inorgánicas, compuestos orgánicos, fitohormonas y materiales inertes de soporte (Merino, 2001). La nutrición de los explantes utilizados en la micropropagación varía según la especie con la que se trabaja, así como con el tipo de explante de una misma especie (Murashige y Skoog, 1962).

El medio más ampliamente utilizado en micropropagación de plantas, es el medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962), con buenos resultados en una amplia diversidad de especies (Iliev *et al.*, 2010). Otro medio bastante utilizado, especialmente en plantas leñosas, es el medio desarrollado por Lloyd y McCown, más conocido como Woody Plant Medium (WPM). Las diferencias de macronutrientes entre ambos medios radican principalmente en la concentración de amonio, nitrato y la concentración total de iones (Bell *et al.*, 2009), las cuales pueden influir en la respuesta morfogénica de los explantes durante el proceso de micropropagación.

Catenacci (2014) señala que los explantes provenientes de brotes apicales de maqui presentaron un mejor desarrollo en medio WPM en comparación a explantes de brotes laterales cultivados en medio MS, además de presentar desarrollo radical sin necesidad de adición de reguladores de crecimiento. En base a lo anterior, el cultivo de explantes de brotes apicales en WPM sería la condición óptima para la micropropagación de maqui.

2.10 Desordenes fisiológicos asociados al cultivo *in vitro*

Se han generado problemas en la micropropagación como la vitrificación en los explantes (George, 1993), cuyo fenómeno se debe a un desorden fisiológico, que comprende grandes cantidades de agua residual en los espacios apoplásticos de la planta (Etienne y Berthouly, 2002). Este desorden se manifiesta con órganos vegetales aéreos traslúcidos o que presentan una transparencia en hojas, tallos y brotes. El exceso de agua en la célula provoca comúnmente problemas en respuestas de diferenciación y deformaciones a nivel tisular (Debergh, 1992; Kevers *et al.* 1951). Durante la transición de estos explantes del laboratorio al vivero, el número de individuos se reduce drásticamente (60%) por la condición de hiperhidratación (Panques, 1991). A principios de los años 90 Alvard *et al.* (1993) demostraron una condición favorable para la micropropagación en los SIT (Sistema de inmersión temporal), lo cual permite evitar este fenómeno, con un cambio del medio y tiempos acotados de inmersión.

2.11 Bioreactor en la biotecnología

Un bioreactor es un recipiente o sistema que mantiene un ambiente biológicamente activo. La función que cumple un bioreactor consiste en llevar a cabo un proceso químico que involucra organismos o sustancias bioquímicamente activas, producidas por dichos organismos. Este proceso puede ser aeróbico o anaerobio. En términos generales, esta tecnología tiene como objetivo proporcionar un ambiente propicio (pH, temperatura, concentración de oxígeno, entre otros) al organismo o sustancia química que se cultiva para su desarrollo (Schmidt, 1998). Los bioreactores también son utilizados para el crecimiento de células o tejidos en operaciones de cultivo.

2.12 Sistemas de inmersión temporal (SIT)

En el año 1997 surgió el denominado Sistema de Inmersión Temporal (SIT), creado en el CIRAD (Centro de Cooperación Internacional en Investigación Agronómica para el Desarrollo) de Francia. Este sistema se logró a partir de la aplicación de un flujo de aire a uno de sus frascos, el cual hacía subir el medio de cultivo y luego de bañar los explantes, el medio descendía por gravedad (Teisson *et al.*, 1996).

El sistema SIT es una tecnología de cultivo de tejidos de nueva generación, y la inmersión cronometrada de los tejidos vegetales en un medio líquido permite la aireación de los cultivos (Balogun *et al.*, 2014). Tiene como objetivo simplificar el cultivo a gran escala dentro de un laboratorio en un pequeño espacio y totalmente aséptico. Estos sistemas han sido ampliamente utilizados en la micropropagación, además de la producción de metabolitos secundarios, en transformación genética y en selección clonal entre otros. El sistema entrega organismos más desarrollados de forma más eficiente en un tiempo acotado (Georgiev *et al.*, 2014). En los sistemas SIT, la renovación de la atmósfera dentro del recipiente de cultivo es más frecuente y sin requerir el medio de cultivo, lo que reduce el riesgo de desarrollar brotes hiperhídricos debido a las repetidas inmersiones en el sistema (Ducos *et al.*, 2008).

La tecnología del sistema de inmersión temporal (SIT) es una forma de propagación que hace crecer las plantas rápidamente al sumergirlas de forma intermitente en nutrientes líquidos en recipientes de laboratorio estériles (bioreactores) (Adelberg y Simpson, 2002).

Los sistemas de cultivo líquido tienen efectos significativos en las tasas de multiplicación y la morfología de los brotes, embriones somáticos, micro-tubérculos o bulbos producidos *in vitro* (Preil, 2005). El establecimiento de cultivos en medio líquido es un paso importante hacia la automatización señala Aitken-Christie *et al.* (1995).

En los sistemas regenerativos organogénicos, los beneficios están asociados con un aumento en la proliferación de brotes y mejores respuestas en la etapa de aclimatación. Además, estos sistemas disminuyen los costos de producción al reducir la manipulación, el trabajo, el área y el número de contenedores (Etienne y Berthouly 2002).

Asimismo, Gupta y Ibaraki (2006) hacen un alcance a la inclusión de principios y métodos de ingeniería que han transformado las técnicas *in vitro* fundamentales para convertirse en tecnologías comercialmente viables, ampliando y automatizando los procesos de propagación *in vitro*, que como consecuencia tienen un impacto reduciendo sus costos de operación.

Existen múltiples cultivos que ya son sometidos a esta tecnología como el café (Etienne, *et al.*, 1997), el banano (Aragon *et al.*, 2005), la caña de azúcar (Posada-Pérez, *et al.*, 2003), el guayabo (Vilchez y Albany., 2014), eucalipto (Gonzalez, *et al.*, 2011), pino (Aitken-Christie, *et al.*, 1984), entre otros.

Se ha encontrado que el mejor método es que se sumerjan temporalmente los tejidos en el medio de cultivo líquido en lugar de continuamente. Este método fue desarrollado por (Alvard *et al.*, 1993) para la micropropagación de bananos, siendo también adaptado para el cultivo de embriones somáticos por (Escalant *et al.*, 1996). A raíz de esto se desarrollaron diferentes técnicas y varios tipos de SIT los cuales han dado resultados exitosos en la micropropagación de varias especies por microcortes o embriogénesis somática, después de una considerable reducción del tiempo de inmersión (Alvard *et al.*, 1993; Teisson *et al.*, 1996; Escalona, 2000 y Kosky *et al.*, 2000).

En otros estudios señalan las ventajas de estos sistemas de inmersión temporal en la micropropagación, ya que aumenta la fotosíntesis, el número de hojas y raíces además del peso seco durante la aclimatación *ex vitro* (Rodríguez *et al.*, 2005; Aragón *et al.*, 2005).

2.13 SIT SETIS

El bioreactor SETIS es un concepto mejorado de los sistemas de inmersión SIT. Tiene un costo bajo de inversión, es fácil de manejar, compacto, seguro y posee una superficie rectangular que permite maximizar los espacio en repisas y cuartos de cultivo (© Duchefa Biochemie 2019).

Este tipo de bioreactor utiliza aire comprimido para mover el medio líquido desde el depósito del medio hasta el recipiente de la planta, pero emplea la fuerza de gravedad para devolver el medio al recipiente del medio. Esto ahorra mucha energía y asegura un drenaje completo. Uno de los componentes más destacables del bioreactor tipo SETIS es la provisión para ventilación (Balogun *et al.*, 2014).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de trabajo

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de cultivo *in vitro* perteneciente al Centro de Plantas Nativas de Chile de la Universidad de Talca.

3.2 Material Vegetal

Se trabajó con plantas de maqui propagadas por cultivo *in vitro* del clon “Luna Nueva”.

3.3 Material de laboratorio

Bisturí, pinzas, placa petri, mechero, papel aluminio, papel craft, parafilm, láminas de propileno, elásticos, 20 frascos de vidrio, puntas de pipetas, una probeta, una piseta, 6 imanes, 4 embudos, 16 rejillas, un vaso precipitado. Por cada SETIS se utilizaron 2 filtros, 1 m de tubo de silicona, 2 tapas, 2 gomas.

3.4 Reactivos

Medios de cultivo (Woody Plant y Murachige y Skoog), alcohol 70°, acetona, myo-inositol, Bencilaminopurina, Ácido giberélico,

3.5 Herramientas para el proceso:

Autoclave, cámara de flujo laminar, micropipeta, tubos fluorescentes, balanza analítica, bomba peristáltica, pH-metro, agitador magnético, compresor, SETIS system (Vervit, Belgium, distributed by Duchefa Biochemie, The Netherlands), válvulas solenoides, manguera conductora de aire, programador, repisa, aire acondicionado.



Figura 1 válvulas, programador y SETIS.

3.6 Obtención de plantas a través de cultivo *in vitro*

Como material vegetal estandarizado y consolidado, se seleccionó plantas madres sanas (control sanitario), en condiciones controladas (nutrición mineral, riego), con el objetivo de proporcionar el crecimiento óptimo de la planta. De los nuevos brotes obtenidos se cortaron y desinfectaron segmentos nodales que fueron introducidos en frascos con medio de cultivo (MS) siendo posteriormente establecidos *in vitro* en un medio WP.

3.7 Esterilización de instrumentos y herramientas

Previo al ingreso de los explantes se esterilizó todo el material utilizado en la cámara de flujo laminar, con el objetivo de garantizar la asepsia y evitar contaminaciones de patógenos. La esterilización de los medios de cultivo se realizó por autoclavado, durante 20 minutos a 121°C y 0,1 MPa de presión. Cualquier herramienta que no pueda ser autoclavada, se sometió a una minuciosa limpieza con alcohol para minimizar los factores de contaminación.

3.8 Sistema de inmersión temporal (SETIS)

El sistema de inmersión temporal consta principalmente de dos recipientes, que cuentan con salidas en los extremos inferiores interconectados por tubos de silicona que permiten el flujo del medio de cultivo entre ambos contenedores por medio de presión. Cada tubo de silicona cuenta con filtros para limpieza del aire comprimido que ingresa por las tuberías que están conectadas con una matriz que suministra aire comprimido. Finalmente se establecen los tiempos y frecuencias de inmersión en un programador de riego dispuesto en cada repisa.



Figura 2: Esquema del mecanismo de acción del sistema SETIS (Vervit 2013). Fase 1: Fase estacionaria; Fase 2: Fase inmersión; Fase 3: Fase finalización de la inmersión; Fase 4: Fase ventilación.

3.9 Preparación del Medio de cultivo

El ensayo fue programado para la etapa de multiplicación de explantes, por lo que el medio de cultivo utilizado corresponde a sales WP suplementadas con hormonas para la multiplicación de los explantes (agua destilada, azúcar, mio-inositol, Ácido giberélico (GA₃), Bencilaminopurina (BAP), pH 5,7. Se preparó el mismo medio de cultivo de multiplicación llamado MM para todos los tratamientos con la diferencia que los tratamientos control incluyen la utilización de agar para gelificar el medio.

3.10 Dispensar medio nutritivo en frascos y SETIS

Luego de esterilizar el medio de cultivo se dejó enfriar en la cámara de flujo laminar y fue sometido durante 10 minutos a radiación ultravioleta. Al finalizar este proceso se encendió el flujo y se introdujeron las fitohormonas mediante micropipetas. Se homogenizó el medio a través de un agitador magnético y se procedió a dispensar en los frascos y SETIS respectivamente. Para el caso de los frascos se debió utilizar la bomba peristáltica que inyecta una cantidad justa de medio de cultivo (65 ml), y una probeta para poder medir el medio de cultivo (400 ml) e introducirlo al recipiente inferior del SETIS.

3.11 Introducción de los explantes

De las plantas que se encontraban establecidas en cultivo *in vitro* se seleccionaron los explantes que se ajustaban a cada ensayo. La selección consistió en explantes de 3 cm en el primer ensayo y de 2 cm en el segundo ensayo, sin presencia de contaminaciones o necrosis. Al momento de montar cada ensayo se dispuso los explantes sobre una hoja de papel esterilizado, la cual sirvió como soporte para poder trabajar y estandarizar los brotes cortando el ápice y la base de cada uno. Posteriormente, los explantes fueron dispuestos en el receptáculo superior del SETIS y en frascos con medio sólido para el tratamiento control.

3.12 Condiciones físicas en la cámara de cultivo

Las condiciones físicas seleccionadas para realizar el cultivo comprenden un fotoperíodo de 16 h luz (con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD) de 70 $\mu\text{mol}^{-2}\text{s}^{-1}$) y 8 h de oscuridad a una temperatura de 22 °C y una humedad relativa del 50%.

3.13 Disposición del ensayo

Se utilizó una repisa con cuatro estanterías dispuestas para 16 SETIS bajo tubos fluorescentes con luz blanca. Cada estantería cuenta con un programador de riego que proporciona la frecuencia y tiempo de inmersión necesaria para cada tratamiento.

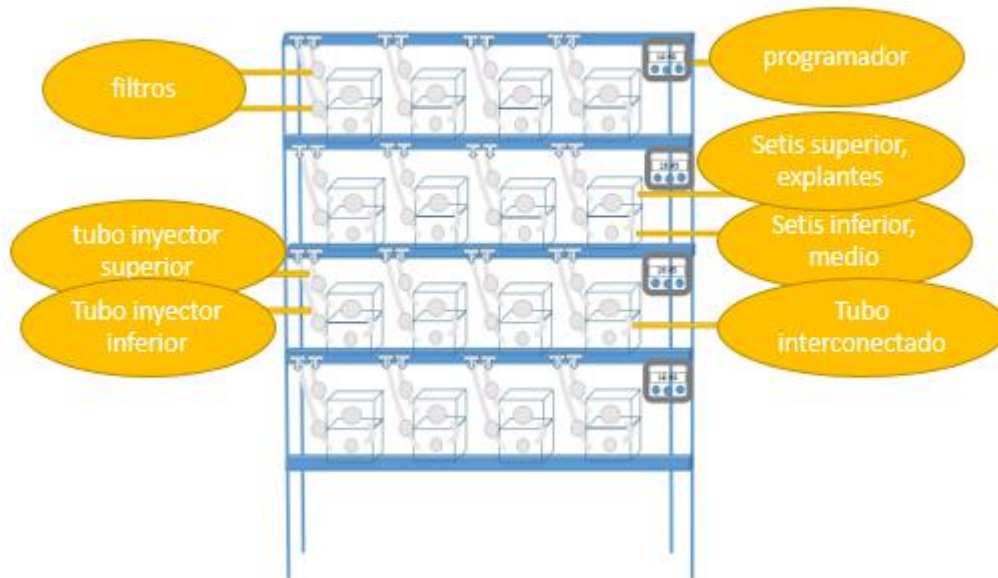


Figura 3 Representación esquemática de la distribución de los SETIS en la repisa.

3.14 Primer ensayo: Efectos de la frecuencia de inmersión ≥ 12 h y tiempos.

Se introdujeron 30 explantes en cada recipiente del sistema SETIS y 15 explantes en cada frasco control (utilizando dos frascos por tratamiento). Los tratamientos consistieron en dos frecuencias de inmersión (12 y 24 horas) y dos tiempos de inmersión (1 y 2 minutos) para el cultivo de los explantes (Cuadro 1). Tras 30 días de iniciado el tratamiento se cambió el medio de cultivo líquido al SETIS y se subcultivaron los explantes control en un medio de cultivo sólido nuevo. La evaluación del cultivo se realizó a los 60 días de iniciado el ensayo.

Cuadro 1 Frecuencia y tiempo de inmersión por cada tratamiento

<i>Frecuencia de inmersión (Horas)</i>	<i>Tiempo de inmersión (minutos)</i>	<i>Tratamiento</i>
12	1	T1
	2	T2
24	1	T3
	2	T4
control	0	T5

3.15 Segundo ensayo: Efectos de la frecuencia de inmersión \leq 12 h

Se introdujeron 20 explantes en cada recipiente del sistema SETIS y 20 explantes en cada frasco control. Los tratamientos consistieron en programar cuatro frecuencias de inmersión cada (12, 10, 8 y 6 horas) y el tiempo de inmersión se mantuvo en un minuto para todos los tratamientos (Cuadro 2). Tras 15 días de iniciado el tratamiento se cambió el medio de cultivo líquido al SETIS y se subcultivaron los explantes control en un medio de cultivo sólido nuevo. La evaluación se llevó a cabo trascurridos 25 días del subcultivo.

Cuadro 2 Frecuencia y tiempo de inmersión por cada tratamiento

<i>Frecuencia de inmersión (Horas)</i>	<i>Tiempo de inmersión (minutos)</i>	<i>Tratamientos</i>
12	1	T1
10	1	T2
8	1	T3
6	1	T4
Control	0	T5

3.16 Diseño experimental

Se distribuyeron 30 explantes para el primer ensayo y 20 explantes para el segundo ensayo por cada réplica (SETIS o frasco) del clon "Luna Nueva", con cuatro repeticiones por tratamiento, donde 16 unidades experimentales engloban el ensayo. Para contrastar ambos medios de cultivo sólido y líquido se consideró el N° de nudos, N° de brotes, largo de brote (cm) y peso (gr) del explante. Además, se analizó el tiempo utilizado por el personal de laboratorio en efectuar cada proceso.

3.17 Criterios de evaluación

- Número de nudos. Se contaron todos los nudos a excepción de la yema apical.
- Altura de los brotes (cm). Se realizó con una regla graduada y se midió desde la base del tallo hasta la inserción de la primera hoja.
- Se determinó el número de brotes finales sobre el número de brotes iniciales.
- Masa fresca de los brotes (mg).
- Número total de brotes.
- Número de explantes con síntomas de hiperhidricidad.
- Tiempo de trabajo y costos de producción de plantas (Cuadro 1):

3.18 Análisis de resultados.

Ambos ensayos fueron realizados con un diseño completamente al azar (DCA). Los resultados fueron analizados con el programa Statgraphics Centurion XVI.II, a través de un ANOVA simple y multifactorial. Los análisis que mostraron diferencias significativas entre los tratamientos se compararon mediante el test de Kruskal Wallis K-W y el test de Duncan, con un 95% de confianza.

4. RESULTADOS

4.1 Primer ensayo: Efectos de la frecuencia de inmersión ≥ 12 h y tiempos.

La serie de análisis realizados arrojaron diferencias entre el crecimiento y desarrollo de la especie *Aristotelia chilensis* en el medio líquido vs. el medio sólido.

4.1.1 Largo de brote

Los explantes cultivados en el medio líquido alcanzaron un largo de brotes (cm) significativamente mayor a los explantes cultivados en el medio sólido (figura 4). En el medio líquido los explantes de los distintos tratamientos lograron alturas similares entre 3 y 4 cm aproximadamente, correspondiendo el valor más alto al tratamiento 1 (12 h de frecuencia con un minuto de inmersión). El tratamiento control solo alcanzó 2,8 cm. de largo, sin presentar diferencias significativas con el tratamiento 3

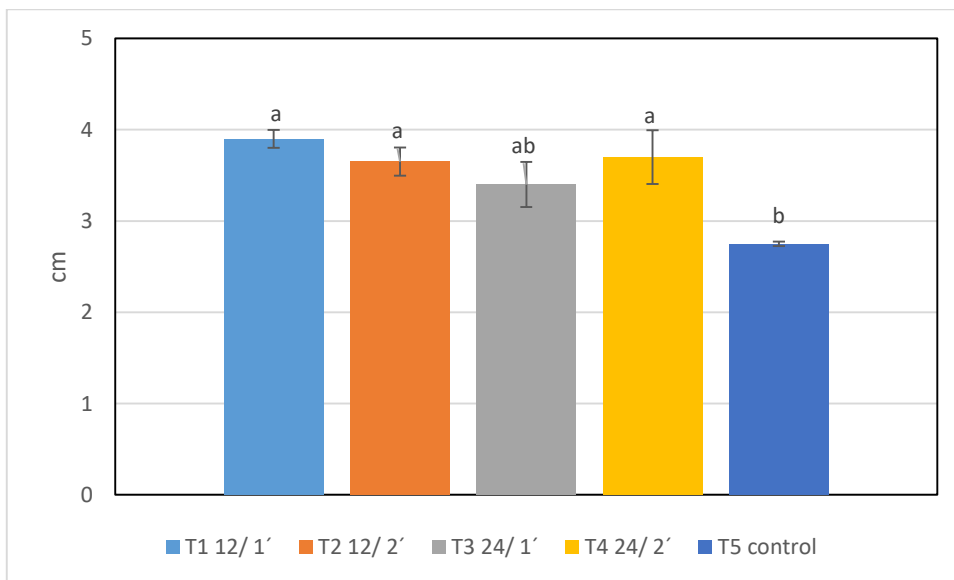


Figura 4 Largo de brotes.

Medias con letras no comunes en las barras difieren estadísticamente para $p < 0,05$ según la prueba de Duncan.

4.1.2 Número de Nudos

También en el caso de los nudos formados se observan diferencias entre ambos medios (figura 5). En el medio sólido se formaron en promedio 2,4 nudos contra un promedio de 3,7 nudos formados en el medio de cultivo líquido. Aunque no hubo diferencias entre los tratamientos en SETIS con medio líquido, también en este el tratamiento 1 alcanzó con un promedio de 4,2 nudos por brote, el de valor mayor.

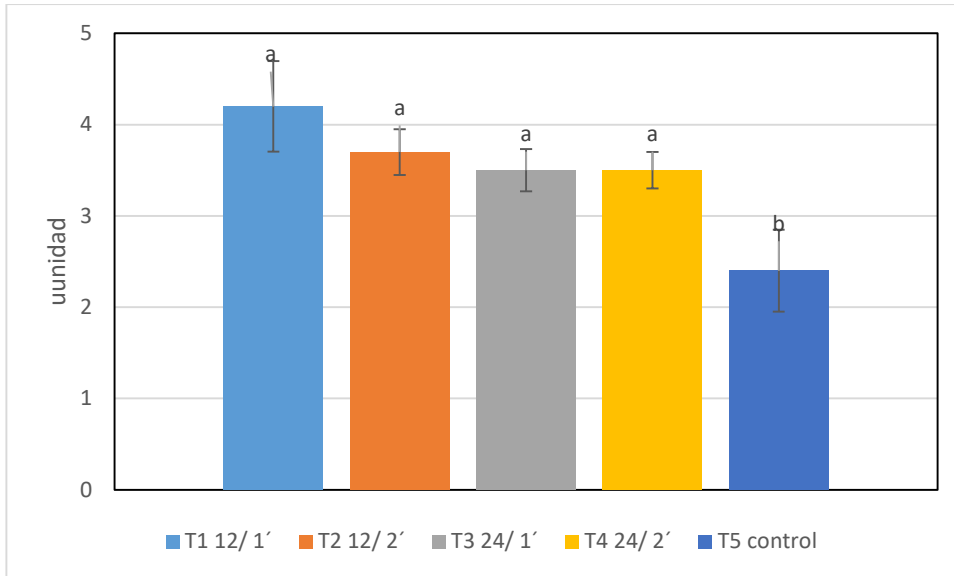


Figura 5 Número de nudos por brote.
Medias con letras no comunes en las barras difieren estadísticamente para $p < 0,05$ según la prueba de Duncan.

4.1.3 Número de Brotes por explante

El tratamiento 1 (frecuencia 12 h – inmersión 1 min) con 16 brotes formados por explante superó significativamente al tratamiento 4 (Frecuencia 24 h – inmersión 2 min) y al control, que formaron 7 y 5 brotes por explante respectivamente. Los tratamientos 2 y 3 presentaron valores intermedios con 10 y 9 brotes por explante respectivamente.

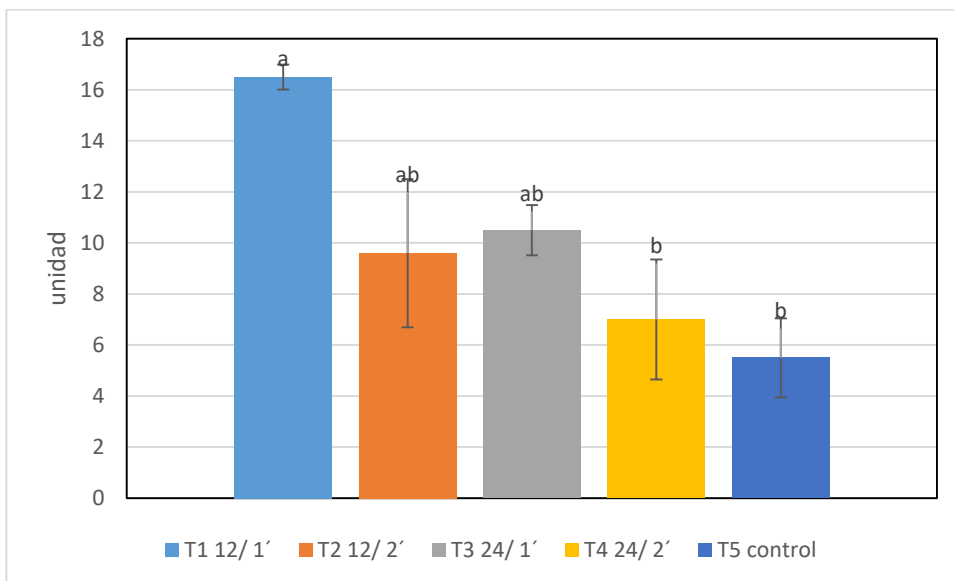


Figura 6 Número de brotes.
Medias con letras no comunes en las barras difieren estadísticamente para $p < 0,05$ según la prueba de Kruskal Wallis.

4.2 Segundo ensayo: Efectos de la frecuencia de inmersión ≤ 12 h.

El objetivo de este ensayo consiste en evaluar la frecuencia de inmersión óptima para la multiplicación de maqui.

4.2.1 Peso final del explante

Los explantes cultivados en sistema SETIS alcanzaron un mayor peso final que los explantes control (figura 7). El mayor peso final promedio del explante se encontró en el tratamiento T1 con 1010 mg y el mínimo promedio en el tratamiento control T5 con 110 mg.

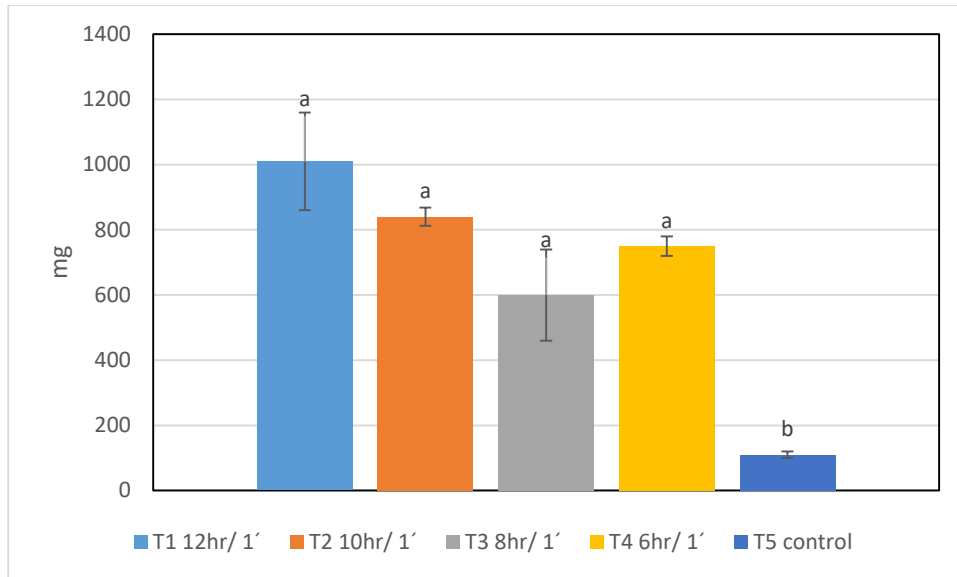


Figura 7 Peso final explante.

Medias con letras no comunes en las barras difieren estadísticamente para $p < 0,05$ según la prueba de Kruskal- Wallis.

4.2.2 Peso final del brote

El peso final del brote de los explantes cultivados en medio líquido también superó el peso promedio final del brote de los explantes control cultivado en medio sólido (figura 8). El máximo promedio fue encontrado en el tratamiento T4 con 58,4 mg y el mínimo promedio fue obtenido en el tratamiento control T5 con 19 mg.

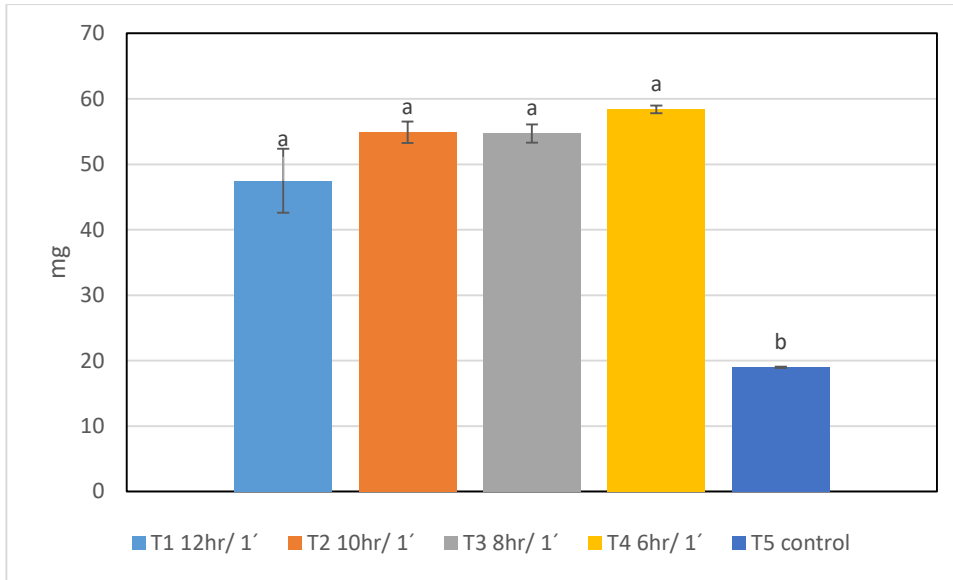


Figura 8 Peso final del Brote.
Medias con letras no comunes en las barras difieren estadísticamente para $p < 0,05$ según la prueba de Duncan.

4.2.3 Largo del brote

Se observó una diferencia significativa entre el largo promedio del brote de los tratamientos en SETIS y el tratamiento control, donde los tratamientos en SETIS alcanzando los primeros valores entre 2 y 3 cm aproximadamente y el tratamiento control solo 1,8 cm (figura 9).

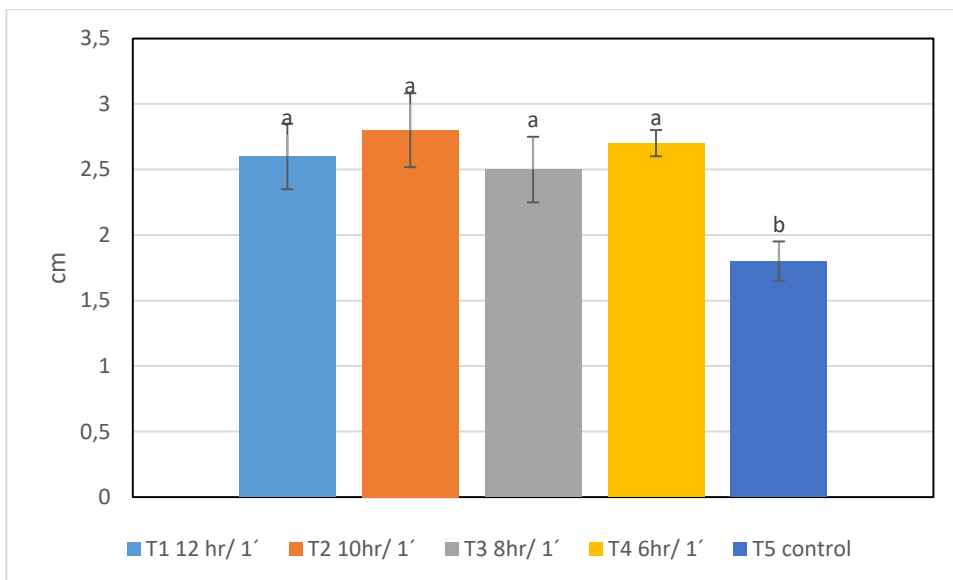


Figura 9 Largo de brote.
Medias con letras no comunes en las barras difieren estadísticamente para $p < 0,05$ según la prueba de Duncan.

4.2.4 Número de nudos por brote

Tanto los explante cultivados en SETIS como los explantes control formaron la misma cantidad promedio de nudos por brote (figura 10). El máximo promedio correspondió al tratamiento T2 con 2,6 nudos y el mínimo promedio al tratamiento control T5 con dos nudos.

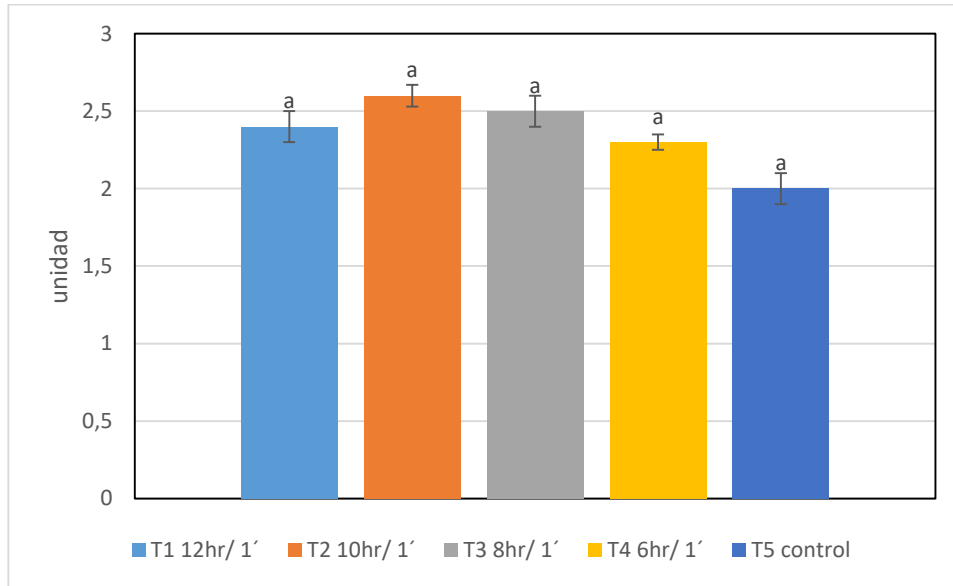


Figura 10 N° de nudos por brote
no se cumplen los supuestos de homogeneidad de varianza y tampoco el valor $p < 0,05$ en la prueba de Kruskal-wallis.

4.2.5 Número de brotes nuevos

También el total de brotes nuevos formados por explante difirió entre los SETIS y el tratamiento control (figura 11). El máximo promedio correspondió al tratamiento T1 con 9,1 brotes nuevos por explante y el mínimo promedio correspondió al tratamiento control con 2,9 brotes nuevos.

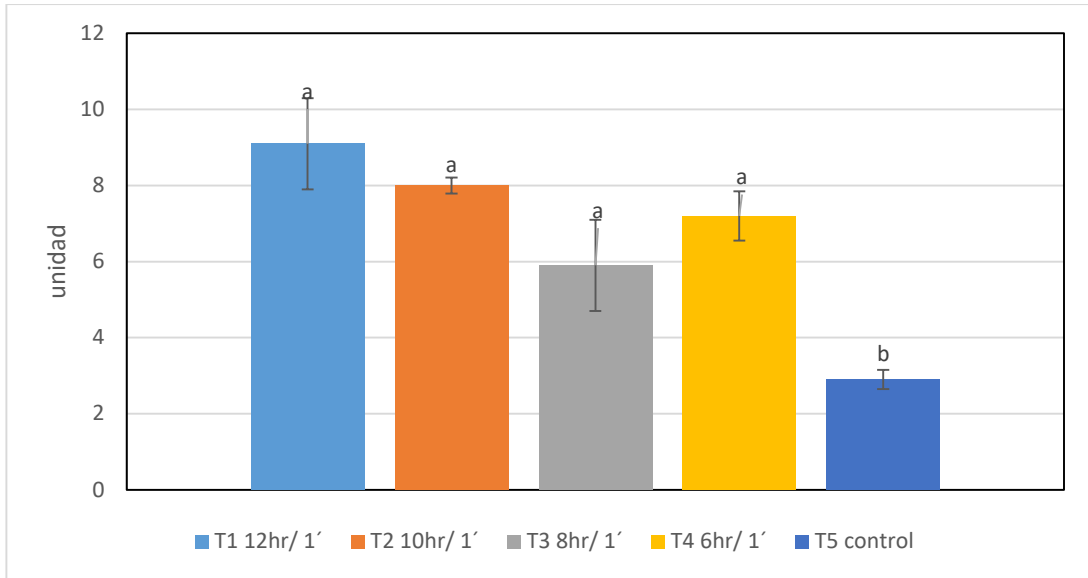


Figura 11 N° de brotes nuevos.
Medias con letras no comunes en las barras difieren estadísticamente para $p < 0,05$ según la prueba de Kruskal Wallis.

4.2.6 Hiperhidricidad

En la tabla 1 se describen los porcentajes de hiperhidricidad para cada tratamiento. A medida que aumenta la frecuencia de inmersión el desorden fisiológico por hiperhidricidad fue en aumento. Este desorden se presentó en menor porcentaje en el Tratamiento 1 (1%) y el Tratamiento 5 (3%). Por el contrario, el máximo promedio se observó en el tratamiento T4 con 20% de hiperhidricidad.

Tabla 1 Hiperhidricidad (%) en los respectivos tratamientos.

Tratamiento	Hiperhidricidad (%)	desviación estándar	error estándar	separación de medias
T1 12 h	1,3	±2,5	±1,3	a
T2 10 h	10	±14,1	±10	abc
T3 8 h	13,8	±4,8	±2,4	ab
T4 6 h	20	±7,1	±3,6	c
Testigo MS	2,5	±2,9	±1,5	a
Levene	0,011614	P/ Test	0,018 K-W	

4.12 Producción de plantas en SETIS v/s in vitro

En las condiciones del laboratorio (cámara de cultivo de 4,5 m²) en una temporada del proceso de multiplicación en cultivo *in vitro* con dos operarios trabajando se pueden producir 27.000 plantas en frasco (9000 explantes por 3 nudos). En el mismo período de tiempo en SETIS con dos operarios trabajando se pueden producir 81.000 plantas (9000 explantes por 9 nudos). Lo que indican que el cultivo en SETIS ahorra al menos un mes del proceso de multiplicación, esto implica menor utilización de la mano de obra, materiales, reactivos que se traducen en un menor costo de la planta final. Incluso ya en la primera multiplicación los costos de la producción en SETIS son un 20% menor que los costos de multiplicación *in vitro* tradicional.

Tabla 2 Comparación entre cultivo in vitro tradicional v/s SETIS, en multiplicación de explantes por nudos.

<i>Establecimiento in vitro</i>		Multiplicación*1	Multiplicación*2	Enraizamiento	Aclimatación
9000 explantes	<i>In vitro</i>	(9000*3 =27000)	(27000*3= 81000)	√	√
9000 explantes	SETIS	(9000*9= 81000)	X	√	√

5. DISCUSIÓN

El manejo óptimo de las condiciones de aireación y disponibilidad del medio de cultivo *in vitro* en los SIT juega un papel muy importante en el proceso de adaptación, específicamente en la fase de aclimatización. De esta forma se garantiza el desarrollo de plántulas que alcancen la calidad requerida para poder adaptarse en el menor tiempo posible a los cambios ambientales que se producen en ésta etapa (Korneva *et al.*, 2013). Determinar el tiempo y frecuencia de inmersión durante la fase de multiplicación del cultivo para cada especie en específico es crucial para favorecer la propagación de forma exitosa e incluso en las variedades dentro de una misma especie, esto es determinante para la absorción de nutrientes por los brotes y el control de la hiperhidricidad (Berthouly y Etienne, 2005).

En el caso de la variedad “Luna Nueva” la comparación entre la multiplicación de explantes en medio sólido por cultivo *in vitro* y medio líquido a través de SETIS arrojó resultados que demuestran la superioridad del SETIS. Los mejores resultados se obtuvieron con un tiempo de inmersión de un minuto y una frecuencia de 12 horas. En el primer ensayo se obtuvieron 4,2 nudos y en el segundo ensayo se obtuvieron 2,4 nudos respectivamente, solo se observaron diferencias significativas con respecto al medio sólido en el primer ensayo, donde el contraste fue de 4,2 nudos en SETIS v/s 2,5 nudos en el control. Análogamente con el largo de los brotes, las diferencias son significativas entre los SETIS (2,6 cm el primer ensayo y 3,9 cm el segundo ensayo) y el control (1,8 cm el primer ensayo y 2,7 cm el segundo ensayo). Sin embargo, un estudio realizado en el guayabo Vilchez y Albany (2014) observaron que en un tiempo de inmersión de dos minutos el número de nudos y número y largo de brotes fueron superiores a los obtenidos con el tiempo de inmersión de un minuto, siendo esta tendencia de los resultados similar a la reportada por González *et al.* (2011) quienes encontraron que la tasa de multiplicación de microesquejes de *Eucalyptus globulus* fue significativamente mayor al aumentar el tiempo de inmersión de 1 a 2 minutos.

En el caso del maqui con la variedad “Luna Nueva”, con una frecuencia de 12 horas y 1 minuto de inmersión, el número de brotes por explante aumentó significativamente al segundo mes de cultivo con respecto a los otros tratamientos. Es decir, si tras dos meses de cultivo cada brote tiene en promedio 3,5 nudos y con el mejor tratamiento se obtienen 16,5 brotes nuevos, se puede estimar una cantidad de nudos o segmentos nodales obtenidos por explante de 58, en comparación con 13 nudos que se obtendrían con el control (5,5 brotes de 2,4 nudos). Por lo tanto, en dos meses de cultivo en SETIS (medio líquido) se obtiene una eficiencia de 70% con respecto a cultivo *in vitro* (medio sólido). Al disminuir la frecuencia de inmersión (12, 10, 8, 6 h) y hacer un análisis al mes de cultivo se observa que el número de brotes obtenidos con frecuencia 12 h (9 brotes) es similar al obtenido tras 10 h de frecuencia de inmersión (8 brotes) y en todos los casos superior al cultivo *in vitro* (3 brotes). Un buen

parámetro para determinar el mejor tratamiento es el número de brotes, muy utilizado en la literatura, como es el caso de la especie *Malanga* (Teisson *et al.*, 1996, Kozai *et al.*, 1997 y McAlister *et al.*, 2005) la cual ha obtenido resultados favorables en términos de multiplicación de brotes gracias a la frecuencia y el tiempo de inmersión 4 h/ 14'. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por McAlister *et al.* (2005), quienes obtuvieron más del doble de generación de brotes con respecto al medio semisólido en diferentes clones de *Eucalyptus spp.* Según Preil (2005), este aumento se puede deber principalmente a que la absorción de nutrientes y reguladores del crecimiento se lleva a cabo por toda la superficie del tejido, lo que puede maximizar el desarrollo del explante.

En la especie *Cymbopogon citratus*, ampliamente utilizada para la extracción de metabolismo secundario citronenol, se demostró un mayor desarrollo de biomasa en los SIT en contraste al medio sólido (Quiala *et al.*, 2006). También en la variedad de maqui "Luna Nueva" se obtuvo un mayor peso del explante en los tratamientos en SETIS (1010 mg) v/s los tratamientos control (110 mg). Así mismo en el peso del brote por cada explante, se observaron diferencias significativas respecto a los tratamientos en SETIS v/s el control, ya que los pesos promedio en medio líquido alcanzaron hasta los 58 mg para el tratamiento 4 respectivamente, y en medio sólido solo alcanzó 18 mg en promedio. Estos resultados obtenidos y contrastados con la literatura indican que los sistemas de inmersión temporal son ampliamente superiores, en la formación de biomasa.

En la especie de *Eucalyptus spp* González *et al.*, (2011) señalan que un aumento de la frecuencia y duración de la inmersión, unido a mayores concentraciones hormonales en el medio de cultivo, pueden favorecer la aparición del fenómeno de hiperhidricidad en los microtallos. En este estudio se realizaron mediciones de pH que indicaron que un mayor tiempo de contacto de los microtallos con el medio de cultivo, ya sea aumentando la frecuencia de inmersión o bien aumentando el tiempo de duración de cada inmersión, genera una mayor acidificación del medio líquido. La relación de este desorden fisiológico se presenta con mayor frecuencia en los tratamientos con múltiples frecuencias de inmersión, 6 h (59%) y 12 h (53%) respectivamente, presentando hiperhidricidad. En contraste, el tratamiento con menor hiperhidricidad de los brotes, se observó en el tratamiento de 48 h (32 %). Esto se correlaciona con los resultados obtenidos en el caso de la variedad "Luna Nueva", ya que se produce un aumento de hiperhidricidad a medida que se aumenta la frecuencia de inmersión (entre 40 y 60%). Con frecuencia de 12 h y el tratamiento control son muy similares las medias de hiperhidricidad (1 y 0,1%), no observándose diferencias significativas.

6. CONCLUSIÓN

Las comparaciones entre medio líquido y sólido mostraron una diferencia significativa, tal y cómo se plateó en la hipótesis de éste trabajo, lográndose un mejor desarrollo de los explantes de la variedad “Luna Nueva” de maqui con el uso del sistema SETIS. La literatura consultada sobre los SIT apunta a la accesibilidad del medio de cultivo líquido que permite un mejor desarrollo de los explantes, lo cual fue corroborado con los ensayos realizados. Los resultados obtenidos arrojaron que con una frecuencia de 12 h durante 1 minuto de inmersión se genera mayor productividad y menores desordenes fisiológicos en explantes, lo que permitió establecer un protocolo para esta variedad en particular en la fase de multiplicación. Otra ventaja del cultivo en SETIS con respecto al cultivo *in vitro*, es la reducción de los costos y del tiempo de propagación por el mismo número de plantas. Estos resultados contribuyen en el desarrollo de nuevos protocolos para las variedades de *A. chilensis*, ayudando a multiplicar la especie de forma más eficiente y a utilizar el SETIS como una nueva tecnología a incorporar en la micropropagación de especies vegetales.

7. Bibliografía

Adelberg, J.W. and Simpson, E.P. 2002. Intermittent Immersion Vessel Apparatus and Process for Plant Propagation.

Aitken-Christie, J., Jones, C., & Bond, S. (1984). Wet and waxy shoots in radiata pine micropropagation (pp. 93-100).

Alvard D, Cote F y Teisson C (1993) Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Effects of temporary immersion. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 32: 55-60

Aragón CE, Escalona M, Capote I, Pina D, González-Olmedo J (2005) Plantain (*Musa AAB*) growth in Temporary Immersion *Biología Vegetal* Vol. 7, No. 3, 2007.

Avello, M., R. Valdivia, R. Sanzana, M. Mondaca, S. Mennickent, V. Aeschlimann, M. Bittner, J. Becerra. 2009. Extractos antioxidantes y antimicrobianos de *Aristolelia chilensis* y *Ugni molinae* y sus aplicaciones como preservantes en productos cosméticos. *BLACPMA* 8(6), 479-486.

Balogun, M., Maroya, N., Asiedu, R., & Taiwo, J. (2014). Novelty, rapidity and quality in seed yam production: the case of Temporary Immersion Bioreactors.

Bell, R.L., Srinivasan, C. and Lomberk, D. 2009. Effect of nutrient media on axillary shoot proliferation and preconditioning for adventitious shoot regeneration of pears. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*; 45, 6.

Berthouly, M., & 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, Dordrecht.

Bhojwani, S. and Razdan, M.K. (1996). *Studies in Plant Science. Plant Tissue Culture: Theory and Practice, a Revised Edition*. Elsevier Science. 779 p.

Brauch JE, Buchweitz M, Schweiggert RM, Carle R (2016) Detailed analyses of fresh and dried maqui (*Aristolelia chilensis* (Mol.) Stuntz) berries and juice. *Food Chem* 190:308–316

Brauch JE, Reuter L, Conrad J, Vogel H, Schweiggert RM, Carle R (2017) Characterization of anthocyanins in novel Chilean maqui berry clones by HPLC–DAD–ESI/MSⁿ and NMR-spectroscopy. *J Food Compos Anal* 58:16–22

Castro D, González-Olmedo J (2005) Cultivo mixotrófico de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden en Biorreactores de Inmersión Temporal. *Memorias Congreso Internacional Biotecnología y Agricultura (Bioveg 2005)*. Ciego de Ávila

Catenacci G,(2014). *DESARROLLO DE PROTOCOLOS DE MICROPROPAGACIÓN EN MAQUI, Aristolelia chilensis (Mol.) STUNTZ*. Tesis de grado no publicada. Universidad de Talca, Talca, Chile.

Céspedes C, Valdez-Morales M, Avila J, El-Hadidfi M, Alarcon J, Paredes-Lopez O (2010) Phytochemical profile and the antioxidant activity of Chilean wild blackberry fruits, *Aristolelia chilensis* (Mol.) Stuntz (Elaeocarpaceae). *Food Chem* 119:886–895

Cirad (centro de cooperación internacional en investigación agronómica para el desarrollo). (2019). Cirad. [Online] Available at: <https://www.cirad.fr/> [Accessed 29 Apr. 2019].

Debergh, P., Aitken –Christie, J., Cohen, D., Grout, B. Von Arnold S., Zimmerman, R. y Ziv, M. 1992. Reconsideration of the term “vitrification” as used in micropropagation plant cell issue and Orgn Culture 30: 135-140.

Delporte C (2007) Determinación de las actividades antiinflamatorias, analgésicas, antioxidantes y antimicrobianas de las hojas de *Aristotelia chilensis* (maqui). Identificación de los compuestos activos, Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 5:136

Dobránszki, J., & da Silva, J. A. T. (2010). Micropropagation of apple—a review. *Biotechnology Advances*, 28(4), 462-488.

Du Q, Jerz G, Winterhalter P (2004) Isolation of two anthocyanin sambubiosides from bilberry (*Vaccinium myrtillus*) by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A* 1045:59–63

Ducos, J. P., Terrier, B., Courtois, D., & Pétiard, V. (2008). Improvement of plastic-based disposable bioreactors for plant science needs. *Phytochemistry Reviews*, 7(3), 607-613.

Escalona MM (2000) Propagación de la piña (*Annanas comosus* (L) Merr) en Sistemas de inmersión temporal. Tesis presentada para optar por el grado a doctor en Ciencias Agrícolas. Ciego de Avila, pp.92

Escalona, M. 2006. Temporary immersion beats traditional techniques on all fronts. *Prophyta annual*. pp 48-50.

Escribano-Bailon MT, Alcalde-Eon C, Muñoz O, Rivas-Gonzalo JC, Santos-Buelga C (2006) Anthocyanins in berries of Maqui (*Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz). *Phytochem Anal* 17:8–14

Etienne H y Berthouly M (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 69: 215-231

Etienne H, Lartaud M, Ferriere N, Carron M, Berthouly M y Teisson C (1997) Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg) using the temporary immersion techniques. *In vitro Cell Development Biol.* 33: 81-87

F., Escalant, J., Etienne, H. and Lartand, M. 1996. Simple apparatus to perform plant tissue culture by temporary immersion. *Acta Hort.* 440: 521-526.

Fredes C, Montenegro G, Zoffoli JP, Gómez M, Robert P (2012) Polyphenol content and antioxidant activity of maqui (*Aristotelia chilensis* Molina Stuntz) during fruit development and maturation in Central Chile. *Chil J Agric Res* 72:582–589

Fredes C, Montenegro G, Zoffoli JP, Santander F, Robert P (2014a) Comparison of the phenolic content, total anthocyanin content and antioxidant capacity of polyphenolrich fruits grown in Chile. *Ciencia e Investigación Agraria* 41:49–61

Fredes C, Yousef G, Robert P, Grace MH, Lila MA, Gómez M, Gebauer M, Montenegro G (2014b) Anthocyanin profiling of wild maqui berries (*Aristotelia chilensis* [Mol.] Stuntz) from different geographical regions in Chile. *J Sci Food Agric* 94:2639–2648

García-González, R., Quiroz, K., Carrasco, B., & Caligari, P. (2010). Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges. *Ciencia e investigación agraria*, 37(3), 5-30.

George, E (1993). Plant propagation by tissue culture. Part 1: the technology. Pp. 337-343. Exegenetics Ltd., Reading, England.

Georgiev, V, Schumann, A, Pavlov, A, Bley, T (2014) Temporary immersion systems in plant biotechnology. Center for Viticulture and Small Fruit Research, Florida A & M University, 6505, Mahan Drive, Tallahassee 32317, USA.

González, R., Ríos, D., Avilés, F., & Sánchez-Olate, M. (2011). Multiplicación in vitro de *Eucalyptus globulus* mediante sistema de inmersión temporal. *Bosque (Valdivia)*, 32(2), 147-154.

Gupta, S. D., & Ibaraki, Y. (Eds.). (2006). *Plant tissue culture engineering* (Vol. 6). Springer Science & Business Media.

Haberlandt, G. 1902. Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien (Math.- Nat. K1.)* III: 69-92.

Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies Jr, F. T., & Geneve, R. L. (1997). *Instructors Manual for Plant Propagation-Principles and Practices*.

Hartmann, H., Kester, D., Davies, F. y Geneve, R. 2002 *Plant propagation. Principles and Practices*. 7 edition. 800 p. Prentice Hall, NJ, New York, USA.

Hartmann, H.; Kester, D.; Davies, F., 1990. *Plant propagation: principles and practices*. Quinta edición. Editorial Prentice Hall Career y Technology . USA. 697 p.

Hoffmann, A. y Marticorena, C. (1987): La vegetación de las islas Oceánicas chilenas. En: *Islas Oceanicas chilenas. Conocimiento Científico y novedades de investigación*. Editor J. C. Castilla – Editorial Universidad Católica de Chile: 127 – 165.

Hussain, A., Qarshi, I.A. Nazir, H. and Ullah, I. 2012. Chapter 1. *Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities*. In: *Recent Advances in Plant In Vitro Culture*. InTech PrePress. 219 p.

Iliev, I., Gajdošová, A., Libiaková, G., & Jain, S. M. (2010). *Plant micropropagation. Plant Cell Culture: Essential Methods*. UK: John Wiley & Sons, 1-23.

Kevers, C., Randolph, L. y Jensen, L. 1951. Embryo culture of barley species hybrids. *Cytological studies of hordeum sativum x hordeum bulbosum*, *J. Heredity* 42:125-134.

Kohlenbach, H. W. (1959). Streckungs- und Teilungswachstum isolierter Mesophyllzellen von *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br. *Naturwissenschaften*, 46(3), 116-117.

Korneva, S., Flores, J., Santos, E., Piña, F., & Mendoza, J. (2013). Plant regeneration of plantain 'Barraganete' from somatic embryos using a temporary immersion system. *Biotechnología Aplicada*, 30(4), 267-270.

Kosky, R. G., de Faria Silva, M., Pérez, L. P., Gilliard, T., Martínez, F. B., Vega, M. R.,... & Mendoza, E. Q. (2002). Somatic embryogenesis of the banana hybrid cultivar FHIA-18 (AAAB) in liquid medium and scaled-up in a bioreactor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68(1), 21-26.

Kozai, T., Kubota, C., & Jeong, B. R. (1997). Environmental control for the large-scale production of plants through in vitro techniques. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 51(1), 49.

Lloyd, G. and B. McCown. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc.* 30:421-427.

Lorenzo JC, González B, Escalona M, Teisson C, Espinosa P, Borroto C (1998) Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell, Tiss. And Org. Cult.* 54(3): 197-200

Marjorie Reyes-Farias, Karla Vasquez, Angelica Ovalle-Marin, Francisco Fuentes, Claudia Parra, Vilma Quitral, Paula Jimenez, and Diego F. Garcia-Diaz (2014) Chilean Native Fruit Extracts Inhibit Inflammation Linked to the Pathogenic Interaction Between Adipocytes and Macrophages.

McAlister, B., Finnie, J., Watt, M, & Blakeway, F. (2005). Use of the temporary immersion bioreactor system (RITA®) for production of commercial

Merino, M.E. 2001. Capítulo 5: Medios de cultivo. En: Cultivo de tejidos vegetales. Editorial Trillas. Sexta Ed. 234 p.

Molina LA, Rodríguez R, Capote I, Huggins C, Pina D, Escalona M, González-Olmedo J (2005) Cultivo fotomixotrófico de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.). Memorias Congreso Internacional Biotecnología y Agricultura (Bioveg 2005). Ciego de Ávila

Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. *Annual review of plant physiology*, 25(1), 135-166.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.

ODEPA | Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. (2019). Exportaciones de maqui chileno crecieron 168% en enero-septiembre de 2015, comparado con igual período de 2014 - ODEPA | Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. [Online] Available at: <https://www.odepa.gob.cl/publicaciones/noticias/noticias-institucionales/exportaciones-de-maqui-chileno-crecieron-168-en-enero-septiembre-de-2015-comparado-con-igual-periodo-de-2014> [Accessed 28 Apr. 2019].

Ottone, J., 1993. Arboles forestales. Prácticas de cultivo. Primera edición editorial Agro Vet S.A. Argentina. 571 p.

Oyanadel, R. (2002). Propagación por esquejes de tres especies medicinales *Buddleja globosa* Hope., *Aristolelia chilensis* (Mol) Stuntz. Y *Aloysia triphylla* L'Her mediante el uso de ácido indolbutírico (Doctoral dissertation, Tesis de grado Licenciado en Agronomía. Escuela de Agronomía. Facultad de Ciencias Agrarias).

Panques, M. 1991. Vitrificación and micropropagation: causes, remedies and prospects. *Acta Horticulture* 319: 95-100.

Pierik, R 1987. In vitro culture of higher plants p.21. Martinus Nijhoff Pub., Dordrecht, The Netherlands.

Posada-Pérez, L., Gómez-Kosky, R., Reyes, M., & Díaz, L. A. (2003). Empleo de los sistemas de inmersión temporal (RITA) en la propagación de plantas vía organogénesis en caña de azúcar y bananos. *Biotecnología vegetal*, 3(1).

Pospíšilová, J., Tichá, I., Kadlecěk, P., Haisel, D. and Plzáková, S. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions. *Biologia Plantarum* 42 (4): 481-497.

Preil, W. (2005). General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for in vitro culture. In *Liquid culture systems for in vitro plant propagation* (pp. 1-18). Springer, Dordrecht.

- Quiala, E., Barbón, R., Jimenez, E., De Feria, M., Chávez, M., Capote, A., & Pérez, N. (2006). Biomass production of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., a medicinal plant, in temporary immersion systems. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 42(3), 298-300.
- Rodriguez, R., Matthei, O. Y Quezada, M. (1983): *Flora arbórea de Chile* Editorial de la Universidad de Concepción. Santiago de Chile. 408 pp.
- Rodríguez, R. 2005: *Elaeocarpaceae* Juss ex DC. In: "Flora de Chile Vol. 2(3) *Plumbaginaceae-Malvaceae*", Ed. C. Marticorena y R. Rodríguez, Universidad de Concepción, Chile. P. 15-16.
- Rojo L.E., Ribnicky, D., Logendra, S., Poulev, A., Rojas-Silva, P., Kuhn, P., Dorn, R., Grace, M., Lila, M., Raskin, I. 2012. In vitro and in vivo anti-diabetic effects of anthocyanins from MaquiBerry (*Aristotelia chilensis*). *Food Chemistry* 131 (2012) 387–396
- Rojo LE, Ribnicky D, Logendra S, Poulev A, Rojas-Silva P, Kuhn P, Dorn R, Grace MH, Lila MA, Raskin I (2012) In vitro and in vivo anti-diabetic effects of anthocyanins from maqui berry (*Aristotelia chilensis*). *Food Chem* 131:387–396
- Schaerer, O., 1951. *Manual práctico sobre multiplicación de plantas*. Segunda Editorial Nacimiento. Chile. 168p.
- Schmidt, Lanny D., *The Engineering of Chemical Reactions*. New York: Oxford University Press, 1998.
- Schrckel, S. y Bitter, M. (2001): *La salud en nuestras manos. Plantas medicinales de Chile, riqueza natural y científica*. Editorial y Grafica Lamas Concepción, Chile. 217 pp.
- Setis-systems.be. (2019). Setis. [online] Available at: <https://setis-systems.be/home> [Accessed 29 Apr. 2019].
- Silva, M.; J. Alarcón; M. Bittner; J. Becerra; L. Sanhueza; C. Marticorena. 1995. *Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz en "270 Plantas Medicinales Iberoamericanas", Ed. M. Gupta, CYTED-CECAB, Bogotá, Colombia. 261-263.
- Teisson, C., Alvard, D., Berthouly, M., Cote, F., Escalant, J., Etienne, H. and Lartand, M. 1996. Simple apparatus to perform plant tissue culture by temporary immersion. *Acta Hort.* 440: 521-526.
- Touati R, Santos SAO, Rocha SM, Belhamel K, Silvestre AJD (2015) The potential of cork from *Quercus suber* L. grown in Algeria as a source of bioactive lipophilic and phenolic compounds. *Ind Crops Prod* 76:936–945
- Vilchez, J., & Albany, N. (2014). Multiplicación in vitro de *Psidium guajava* L. en sistemas de inmersión temporal. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 16(2), 96-103.
- Vogel, H. Razmilic, I. San Martín, J. Doll, U. Golanzalez, B. 2005. *Plantas medicinales chilenas. Experiencias de domesticación y cultivo de Boldo, Matico, Bailahuen, Canelo, Peumo y Maqui*. Primera edición. Editorial Universidad de Talca. Talca. Chile. 178p.
- Vogel, H., González, B., Catenacci, G., & Doll, U. (2016). Domestication and sustainable production of wild crafted plants with special reference to the Chilean maqui berry (*Aristotelia chilensis*). *Julius-Kühn-Archiv*, (453), 50-52.
- Vogel, H., I. Razmilic, J. San Martín, U. Doll, B. González. 2008. Maqui. En *Plantas Medicinales Chilenas*. Editorial Universidad de Talca, 2ª edición, p. 143-158

Vogel, H., Peñailillo, P., Doll, U., Contreras, G., Catenacci, G. and B. Gonzalez, 2014: Maqui (*Aristotelia chilensis*): Morphophenological characterization to design high-yielding cultivation techniques. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 1, 123-133

Anexos

Primer ensayo

Tratamiento	Largo del brote	N° de nudos	N° de brotes
T 1	3,9 ± 0,14 a	4,2 ± 0,7 a	16,5 ± 0,70 a
T 2	3,65 ± 0,31 a	3,7 ± 0,5 a	9,6 ± 5,8 ab
T 3	3,4 ± 0,43 ab	3,5 ± 0,4 a	10,5 ± 1,7 ab
T 4	3,7 ± 0,59 a	3,5 ± 0,4 a	7 ± 4,7 ab
Control	2,75 ± 0,05 b	2,4 ± 0,09 b	5,5 ± 3,1b
Promedio	3,43 ± 0,53	3,3 ± 0,71	9 ± 4,9 b
Levene	0,0612992	0,140313	0,00313047
P/ Test	0,0159/ Duncan	0,0032/ Duncan	0,0814/ K-W

Segundo ensayo

Tratamiento	Peso final explante (mg)	Peso final brote (mg)	Largo del brote (cm)	N° de nudos finales/brote	N° de brotes finales/explante	Hiperhidricidad (%)
T 1	1010 ± 300 a	47,5 ± 9,8 a	2,6 ± 0,5 a	2,4 ± 0,2	9,1 ± 2,4 a	1,3 ± 2,5 c
T 2	840 ± 40 a	54,9 ± 2,3 a	2,8 ± 0,4 a	2,6 ± 0,1	8,0 ± 0,3 a	10,0 ± 14,1 abc
T 3	600 ± 280 a	54,7 ± 2,8 a	2,5 ± 0,5 a	2,5 ± 0,2	5,9 ± 2,4 a	13,8 ± 4,8 ab
T 4	750 ± 60 a	58,4 ± 1,2 a	2,7 ± 0,2 a	2,3 ± 0,1	7,2 ± 1,3 a	20,0 ± 7,1 a
Control MS	110 ± 20 b	19,0 ± 0,2 b	1,8 ± 0,3 b	2,0 ± 0,2	2,9 ± 0,5 b	2,5 ± 2,9 bc
Promedio	640 ± 370	46,0 ± 1,7	2,4 ± 0,5	2,3 ± 0,3	6,4 ± 2,7	9,4 ± 9,2
Levene	0,002	0,06686	0,5227	0,4425	0,0113	0,011614
P / Test	0,0314648/ K-W	0,0003/ Duncan	0,0263/Duncan	0,4814	0,0277405/K-W	0,0188884 K-W

Glosario

Hiperhidricidad: Es un desorden fisiológico que puede ocurrir en el cultivo de tejidos de las plantas. Los tejidos hiperhídricos se caracterizan por una apariencia vidriosa, tallos y hojas traslucidas y una distorsión de sus órganos.

Medio MS: El Medio Murashige & Skoog (MS), o MS0, fue inventado por los científicos Toshio Murashige y Folke K. Skoog en 1962 durante sus investigaciones de nuevos reguladores del desarrollo vegetal y se ha convertido en el medio más comúnmente usado en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales.

Biorreactor: Un biorreactor es un recipiente o sistema que mantiene un ambiente biológicamente activo. En algunos casos, un biorreactor es un recipiente en el que se lleva a cabo un proceso químico que involucra organismos o sustancias bioquímicamente activas derivadas de dichos organismos.

Explante: sección de tejido vivo, transferido a un medio artificial.

Sistemas de inmersión temporal (SIT): Son sistemas semi-automatizados en propagación *in vitro*. Está basado en el contacto intermitente del medio de cultivo líquido con los explantes por un corto período de tiempo y la renovación de la atmósfera gaseosa.

***In vitro*:** En el contexto de la biotecnología, se cultivan secciones de tejidos en recipientes de vidrio en un medio estéril con los nutrientes, hormonas y ambiente estandarizado.

***In vivo*:** el organismo es totalmente autónomo en términos de funcionalidad e interacción con el medio ambiente, produciendo diversos mecanismos para su sobrevivencia.

Organogénesis: Son cambios que se producen, durante el desarrollo de la formación de un órgano determinado.

Totipotencialidad: Las células aisladas de las plantas tienen la capacidad de reproducir su crecimiento, en condiciones de asepsia y el control del ambiente, además de concentraciones hormonales y nutricionales estandarizadas para cada sub especie.