



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**



**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y  
BIOTECNOLOGÍA**

**CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

---

**Tema:** Optimización del protocolo de micropropagación *in Vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) var. Biloxi a partir de segmentos nodales

---

Trabajo de Titulación, modalidad Sistematización de Experiencias Prácticas de Investigación y/o Intervención, previa la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

**Autor:** José Vicente Cepeda Cahuatijo

**Tutor:** PhD. José Homero Vargas López

**Ambato – Ecuador**

**Marzo - 2023**

## **APROBACION DEL TUTOR**

PhD. Jose Homero Vargas López

Certifica

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación modalidad Sistematización de Experiencias Prácticas de Investigación y/o Intervención, el mismo que, responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 23 de enero del 2023

.....

PhD. José Homero Vargas López

C.I. 180197804-8

**TUTOR**

## DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, José Vicente Cepeda Cahuatijo manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación, modalidad Sistematización de Experiencias Prácticas de Investigación y/o Intervención, previo a la obtención del Título de Ingeniería Bioquímica son absolutamente originales, auténticos y personales, a excepción de las citas bibliográficas.



.....

José Vicente Cepeda Cahuatijo

C.I. 180435329-8

**AUTOR**

## **APORBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO**

Los suscritos Profesores Calificadores aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad Sistematización de Experiencias Prácticas de Investigación y/o Intervención, mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

-----  
Presidente del Tribunal

-----  
Dr. William Ricardo Calero Cáceres  
C.I. 171434885-9

-----  
Dra. Liliana Alexandra Cerda Mejía  
C.I. 180414808-6

Ambato, 17 de febrero de 2023

## **DERECHOS DE AUTOR**

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Trabajo de Titulación o parte de este un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la institución.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública. Además, apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



José Vicente Cepeda Cahuatijo

C.I. 180435329-8

**AUTOR**

## **DEDICATORIA**

Este trabajo está dedicado en primer lugar a Dios y todo el esfuerzo ha sido ofrenda para él.

Él sabe dónde, cómo y cuándo da lugar a las cosas, siempre sabrá ubicarme en el lugar preciso para ayudar a quien lo necesite y que en mi se dará únicamente su voluntad.

Se la dedico a todas aquellas personas que me importan, que quiero y que amo, que a pesar del tiempo transcurrido confiaron en mí y aquí está la muestra de mi esfuerzo como muestra de gratitud hacia ellos.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a Dios en primer lugar por la salud, personas y capacidades que me permitieron concluir esta etapa de mi vida, anhelo continuar recibiendo el aire y las motivaciones necesarias para seguir descubriendo más de este mundo maravilloso.

Agradezco a mis padres, Magdalena y José, por su paciencia y enseñanzas y muestras de verdadero amor de familia, me han demostrado que lo más importante son los valores humanos que le permiten llegar a ser quien es.

Agradezco a Alejandra y Paola Rivera, por abrirme las puertas de su establecimiento “LEPLANT”, mismo en el que se llevó a cabo este proyecto y por poner su fe en este trabajo.

Agradezco al PhD. Homero Vargas, por su apoyo durante la elaboración de este trabajo y su calidad de persona que me ha enseñado a confiar en el trabajo propio.

Finalmente agradezco a todas esas personas que me acompañaron en este proceso y que de una u otra manera me extendieron su mano para poder concluir esta etapa de vida y concluirlo con nuevas amistades y excelentes experiencias.

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACION DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iii
APORBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO.....	iv
DERECHOS DE AUTOR.....	v
DEDICATORIA .....	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS .....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xv
RESUMEN EJECUTIVO .....	xvii
ABSTRACT .....	xviii
CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Antecedentes Investigativos.....	1
1.1.1. Generalidades del Arándano .....	1
1.1.2. Descripción del Arándano.....	4
a. Taxonomía.....	4
b. Botánica.....	5
1.1.3. Beneficios del Arándano .....	6
1.1.4. Cultivo de Tejidos Vegetales .....	6
1.1.5. Tipos de cultivos vegetales .....	7
1.1.6. Factores que influyen en el cultivo in vitro.....	8
1.1.6.1. Factores Físicos.....	8

1.1.6.2.	Factores químicos.....	9
1.1.7.	Justificación.....	12
1.2.	Objetivos .....	13
1.2.1.	Objetivo General .....	13
1.2.2.	Objetivos Específicos.....	13
CAPÍTULO II .....		15
METODOLOGÍA .....		15
2.1.	Materiales.....	15
2.1.1.	Materiales de Laboratorio .....	15
2.1.2.	Equipos.....	15
2.1.3.	Reactivos .....	15
2.2.1.	Localización del sitio experimental .....	16
2.2.2.	Material de estudio.....	16
2.2.3.	Selección y transporte del material vegetal.....	17
2.2.4.	Etapa de Introducción <i>in vitro</i> de arándano .....	18
2.2.4.1.	Preparación de medio WPM para plantas leñosas .....	18
2.2.4.2.	Prueba de introducción <i>in vitro</i> con meristemos.....	19
2.2.4.3.	Introducción <i>in vitro</i> a partir de segmentos nodales .....	20
2.2.5.	Etapa de propagación clonal o multiplicación <i>in vitro</i> de arándano .....	22
2.2.5.1.	Optimización de la etapa de multiplicación .....	22
2.2.6.	Etapa de enraizamiento <i>in vitro</i> de los explantes de arándano.....	25
2.2.6.1.	Optimización de la etapa de enraizamiento <i>in vitro</i> de arándano .....	25
2.3.	Diseño experimental.....	26
2.3.1.	Etapa de desinfección.....	26
2.3.2.	Etapa de multiplicación.....	27
2.3.3.	Etapa de enraizamiento <i>in vitro</i> .....	28

2.3.	Interpretación de datos .....	29
CAPÍTULO III.....		30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		30
3.1.1.	Ensayos Preliminares .....	30
3.1.2.	Etapa de Desinfección de los Explantes.....	31
3.1.2.1.	Contaminación por Hongos.....	32
3.1.2.2.	Contaminación por bacterias.....	34
3.1.2.3.	Oxidación .....	35
3.1.2.4.	Viabilidad.....	38
3.1.3.	Etapa de Introducción de los Explantes .....	39
3.1.3.1.	Contaminación por Hongos.....	40
3.1.3.2.	Contaminación por bacterias.....	40
3.1.3.3.	Viabilidad de Explantes .....	41
3.1.3.4.	Oxidación de los Explantes.....	42
3.1.4.	Etapa de Multiplicación .....	44
3.1.5.	Etapa de Enraizamiento.....	45
CAPÍTULO IV.....		48
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		48
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		50
ANEXOS.....		62

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Taxonomía del Arándano.....	4
<b>Tabla 2.</b>	Características Botánicas del Arándano.....	5
<b>Tabla 3.</b>	Composición del medio WPM (Wood Plant Medium).....	10
<b>Tabla 4.</b>	Medio de cultivo WPM para el establecimiento <i>in vitro</i> de arándano...	18
<b>Tabla 5.</b>	Tratamientos de desinfección para arándano .....	22
<b>Tabla 6.</b>	Diseño Experimental Cuadrados Latinos (etapa de multiplicación).....	28
<b>Tabla 7.</b>	Diseño Experimental Cuadrados Latinos (etapa de enraizamiento) .....	29
<b>Tabla 8.</b>	Tratamientos de medios de cultivo para multiplicación de arándano ...	64
<b>Tabla 9.</b>	Tratamientos de medios de cultivo para enraizamiento de arándano ...	65
<b>Tabla 10.</b>	Niveles de variables influyentes en la etapa de <b>multiplicación</b> de <i>V. corymbosum</i> .....	66
<b>Tabla 11.</b>	Diseño Experimental Cuadrados Latinos (etapa de multiplicación).....	66
<b>Tabla 12.</b>	Niveles de variables influyentes en la etapa de <b>enraizamiento</b> de <i>V. corymbosum</i> .....	67
<b>Tabla 13.</b>	Diseño Experimental Cuadrados Latinos (etapa de enraizamiento) .....	67
<b>Tabla 14.</b>	Análisis de Varianza entre la contaminación por hongos vs los tratamientos etapa de desinfección.....	67
<b>Tabla 15.</b>	Prueba de Tuckey entre la contaminación por hongos vs los tratamientos etapa de desinfección .....	68
<b>Tabla 16.</b>	Análisis de Varianza entre la contaminación por bacterias vs los tratamientos etapa de desinfección.....	68
<b>Tabla 17.</b>	Prueba de Tuckey entre la contaminación por bacterias vs los tratamientos etapa de desinfección.....	69
<b>Tabla 18.</b>	Análisis de Varianza entre el oxidado potencial vs los tratamientos etapa de desinfección .....	69

<b>Tabla 19.</b>	Prueba de Tuckey entre el oxidado potencial vs los tratamientos etapa de desinfección.....	70
<b>Tabla 20.</b>	Análisis de Varianza entre el oxidado muerto vs los tratamientos etapa de desinfección.....	70
<b>Tabla 21.</b>	Prueba de Tuckey entre el oxidado muerto vs los tratamientos etapa de desinfección	71
<b>Tabla 22.</b>	Análisis de Varianza entre la viabilidad vs los tratamientos etapa de desinfección.....	71
<b>Tabla 23.</b>	Prueba de Tuckey entre la viabilidad vs los tratamientos etapa de desinfección.....	72
<b>Tabla 24.</b>	Análisis de Varianza entre la contaminación por bacterias vs los tratamientos etapa de introducción.....	72
<b>Tabla 25.</b>	Análisis de Varianza entre la viabilidad de explantes vs los tratamientos etapa de introducción .....	73
<b>Tabla 26.</b>	Análisis de Varianza entre la oxidación potencial vs los tratamientos etapa de introducción .....	73
<b>Tabla 27.</b>	Análisis de Varianza entre la oxidación muerta vs los tratamientos etapa de introducción.....	74
<b>Tabla 28.</b>	Análisis de Varianza entre el índice de crecimiento vs los tratamientos etapa de multiplicación .....	74
<b>Tabla 29.</b>	Prueba de Tuckey entre el índice de crecimiento vs los tratamientos etapa de multiplicación .....	75
<b>Tabla 30.</b>	Análisis de Varianza entre el índice de enraizamiento vs los tratamientos etapa de multiplicación .....	75
<b>Tabla 31.</b>	Prueba de Tuckey entre el índice de enraizamiento vs los tratamientos etapa de multiplicación .....	76

## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Ubicación geográfica del laboratorio de cultivo <i>in vitro</i> Leplant. (Google Maps, 2022).....	16
<i>Figura 2.</i> Plantas madre de arándano ( <i>Vaccinium corymbosum</i> L. var. Biloxi), en invernadero. (Cepeda, 2022).....	17
<i>Figura 3.</i> Material vegetal húmedo ( <i>Vaccinium corymbosum</i> L.). (Cepeda, 2022)	18
<i>Figura 4.</i> <b>A.</b> explante desinfectado. <b>B.</b> Porción de explante con yema axilar. <b>C.</b> Corte y descubierto de yema. <b>D.</b> Yema axilar con capas. <b>E.</b> capas meristemáticas de yema axilar. <b>F.</b> Meristemo sin capas (oxidado). (Cepeda, 2022). .....	20
<i>Figura 5.</i> <b>A.</b> Despojo de hojas <b>B.</b> Corte explantes <b>C.</b> Desinfectantes. <b>D.</b> Tratamiento con agua jabonosa. <b>E.</b> Tratamiento con fungicida <b>F.</b> Tratamiento con alcohol. <b>G.</b> Siembra de explantes <b>H.</b> Explantes sembrados en tubos. (Cepeda, 2022).....	21
<i>Figura 6.</i> <b>A.</b> Despojo de hojas para multiplicación. <b>B</b> y <b>C.</b> Explantes sembrados de 3 cm aproximadamente. (Cepeda, 2022).....	24
<i>Figura 7.</i> Contaminación de los explantes de arándano: <b>A.</b> Oxidación y <b>B.</b> Hongos en yemas de tipo axilar. (Cepeda, 2022).....	30
<i>Figura 8.</i> Índices de contaminación, oxidación y viabilidad de cada uno de los tratamientos en la etapa de desinfección.....	31
<i>Figura 9.</i> Distribución de medias de la variable: contaminación por hongos.....	33
<i>Figura 10.</i> Distribución de medias de la variable: contaminación por bacterias. 34	
<i>Figura 11.</i> Distribución de medias de la variable: oxidado potencial .....	36
<i>Figura 12.</i> Distribución de medias de la variable: oxidado muerto.....	37
<i>Figura 13.</i> Distribución de medias de la variable: viabilidad de explantes .....	38
<i>Figura 14.</i> Índices de contaminación, oxidación y viabilidad de cada uno de los tratamientos en la etapa de introducción.....	39
<i>Figura 15.</i> Distribución de medias de la variable: contaminación por bacterias, fase de introducción .....	40

<i>Figura 16.</i>	Distribución de medias de la variable: viabilidad de crecimiento, fase de introducción.....	41
<i>Figura 17.</i>	Distribución de medias de la variable: oxidado potencial, fase de introducción	42
<i>Figura 18.</i>	Distribución de medias de la variable: oxidado potencial, fase de introducción	43
<i>Figura 19.</i>	Distribución de medias de la variable: porcentaje de crecimiento de las plántulas, fase de multiplicación .....	45
<i>Figura 20.</i>	Distribución de medias de la variable: porcentaje de enraizamiento de las plántulas, fase de multiplicación.....	46

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo A</b>	Diagramas de Proceso .....	62
<b>Anexo 1-A</b>	Procedimiento para introducción <i>in vitro</i> de arándano. ....	62
<b>Anexo 2-A</b>	Procedimiento para multiplicación <i>in vitro</i> de arándano. ....	63
<b>Anexo 3-A</b>	Procedimiento para enraizamiento <i>in vitro</i> de arándano.....	63
<b>Anexo B</b>	Tratamientos de medios de cultivo .....	64
<b>Anexo 1-B</b>	Tratamientos en la etapa de multiplicación.....	64
<b>Anexo 2-B</b>	Tratamientos en la etapa de enraizamiento .....	65
<b>Anexo C</b>	Diseño Experimental.....	66
<b>Anexo 1-C</b>	Diseño Cuadrado Latino etapa de multiplicación. ....	66
<b>Anexo 2-C</b>	Diseño Cuadrado Latinos etapa de enraizamiento. ....	67
<b>Anexo 3-C</b>	Prueba de ANOVA y Tuckey para la contaminación por hongos en la etapa de desinfección .....	67
<b>Anexo 4-C</b>	Prueba de Tuckey entre la contaminación por hongos vs los tratamientos etapa de desinfección.....	68
<b>Anexo 5-C</b>	Prueba de ANOVA y Tuckey para la contaminación por bacterias en la etapa de desinfección .....	68
<b>Anexo 6-C</b>	Prueba de ANOVA y Tuckey para el oxidado potencial en la etapa de desinfección	69
<b>Anexo 7-C</b>	Prueba de ANOVA y Tuckey para el oxidado muerto en la etapa de desinfección	70
<b>Anexo 8-C</b>	Prueba de Tuckey entre el oxidado muerto vs los tratamientos etapa de desinfección	71
<b>Anexo 9-C</b>	Prueba de ANOVA y Tuckey para la viabilidad de explantes en la etapa de desinfección.....	71
<b>Anexo 10-C</b>	Prueba de ANOVA para la contaminación por bacterias en la etapa de introducción	72

<b>Anexo 11-C</b>	Prueba de ANOVA para la viabilidad de explantes en la etapa de introducción	73
<b>Anexo 12-C</b>	Prueba de ANOVA para la oxidación potencial en la etapa de introducción	73
<b>Anexo 13-C</b>	Prueba de ANOVA para la oxidación muerto en la etapa de introducción	74
<b>Anexo 14-C</b>	Prueba de ANOVA y Tuckey para el índice de crecimiento en la etapa de multiplicación .....	74
<b>Anexo 15-C</b>	Prueba de ANOVA y Tuckey para el índice de enraizamiento .....	75
<b>Anexo D</b>	Imágenes del procedimiento y resultado de cada etapa .....	77
<b>Anexo 1-D</b>	Recepción del material vegetal .....	77
<b>Anexo 2-D</b>	Despojo de hojas para introducción por segmentos nodales.....	77
<b>Anexo 3-D</b>	Corte de material vegetal .....	77
<b>Anexo 4-D</b>	Anexo 4-D. agentes desinfectantes .....	77
<b>Anexo 5-D</b>	Tratamientos de desinfección solución jabonosa.....	77
<b>Anexo 6-D</b>	Tratamiento con hipoclorito de sodio .....	77
<b>Anexo 7-D</b>	Tratamiento con fungicida .....	78
<b>Anexo 8-D</b>	Preparación de material para su inoculación.....	78
<b>Anexo 9-D</b>	Prueba de siembra a través de meristemas.....	78
<b>Anexo 10-D</b>	Vista de meristemo a través de estereoscopio.....	78
<b>Anexo 11-D</b>	Explantes introducidos por segmentos nodales.....	78
<b>Anexo 12-D</b>	A. Meristemo oxidado y contaminado B. Explante vivo .....	78
<b>Anexo 13-D</b>	Explantes multiplicados .....	79
<b>Anexo 14-D</b>	Explantes enraizados.....	79
<b>Anexo 15-D</b>	Vista explantes A. multiplicacion B. enaizamiento .....	79
<b>Anexo 16-D</b>	Explantes enraizados.....	79

## RESUMEN

El arándano (*Vaccinium* sp.) es un frutal originario de Norteamérica y distribuido en todo el mundo. El consumo de este fruto se ha incrementado en un 70 por ciento por las propiedades benéficas que brinda a quien las ingiere, destacando entre ellas propiedades antidiarreicas, antiinflamatorias y astringentes por su contenido de taninos. El objetivo general fue optimizar el protocolo de micropropagación *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) a partir de segmentos nodales con base en variaciones de concentraciones de fitorreguladores, volumen de medio nutritivo y densidad de explantes. Se trabajó por medio de un diseño experimental, dividiendo al ensayo en 4 etapas: desinfección, introducción, multiplicación y enraizamiento. El modelo aplicado fue el diseño de cuadrados latinos. Se determinó que en la etapa de introducción la siembra de segmentos nodales presentó el 60 por ciento de viabilidad, 0 por ciento de contaminación por hongos y bacterias y el 85 por ciento de oxidación potencial. Mientras que, en la etapa de multiplicación se obtuvo un índice de crecimiento del 113 por ciento, cuyo mejor tratamiento fue el número 8. Para la etapa de multiplicación se obtuvo el mayor índice de crecimiento con el uso de 2,0 miligramos por litro de citoquinina, 30 mililitros de medio de cultivo y densidad de los explantes igual a 30. Mientras que, para la etapa de enraizamiento se obtuvo el mayor índice a una concentración de 2,5 mg por L de ácido indol-butírico, 800 mg por L de Carbón activado y densidad de explantes igual a 20.

**Palabras clave:** arándano, cultivo in vitro, segmentos nodales, fitorreguladores.

## ABSTRACT

The blueberry (*Vaccinium* sp.) is a native fruit from North America and distributed throughout of the world. The consumption of this fruit has increased by 70 per cent due to the beneficial properties, it provides to those who eat it, highlighting among them anti-diarrheal, anti-inflammatory and astringent properties due to its tannin content. The general objective was to optimize the in vitro blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) micropropagation protocol from nodal segments based on variations in concentrations of phytohormones, volume of nutrient medium, and explant density. An experimental design was used, dividing the test into 4 stages: disinfection, introduction, multiplication and rooting. The model applied was the design of Latin squares. It was determined that in the introduction stage the sowing of nodal segments presented 60 per cent viability, 0 per cent contamination by fungi and bacteria and 85 per cent potential oxidation. While, in the multiplication stage, a growth rate of 113 per cent was obtained, whose best treatment was number 8. For the multiplication stage, the highest growth rate was obtained with the use of 2.0 milligrams per liter of cytokinin, 30 milliliters of culture medium and density of the explants equal to 30. While, for the rooting stage, the highest index was obtained at a concentration of 2.5 mg per L of indolebutyric acid, 800 mg per L of activated carbon and explant density equal to 20.

**Keywords:** blueberry, in vitro culture, nodal segments, phytohormones.

# CAPÍTULO I

## MARCO TEÓRICO

### 1.1. Antecedentes Investigativos

#### 1.1.1. Generalidades del Arándano

El arándano (*Vaccinium* sp.) es un frutal originario y distribuido ampliamente por Norteamérica, Europa Central y Eurasia, actualmente su cultivo se ha domesticado tanto, por lo que se ha evidenciado producción también en América del Sur, África y Madagascar (**Meléndez, et al., 2021**).

Hoy en día, existe una amplia variedad de arándanos obtenidos a través del entrecruzamiento y mejoras genéticas, lo cual ha permitido que se establezcan en climas fríos, cálidos y mediterráneos y por ende, su oferta sea durante todo el año (**Lobos & Hancock, 2015**).

Existe una serie de consideraciones técnicas acerca de las potencialidades y debilidades de las variedades de arándano, los cuales son factores críticos que han permitido determinar su diversidad en el mercado (**González & Morales, 2017**). En función a las zonas agroecológicas de cultivo, se considera el requerimiento térmico, los grados días, el calibre y firmeza del fruto, el período de maduración, floración y postcosecha del fruto (**Bustillo, 2018**).

La variedad más cultivada es la de tipo “Highbush” o arándano alto (*V. corymbosum* L.) con un 80% de las especies cultivadas, anualmente 55 000 toneladas de fruto son recolectadas en una superficie cultivada de 14 000 hectáreas. La especie arándano *V. ashei* JM Reade es cultivada en un 14% y el otro 6% por otras variedades entre las que destacan *V. angustifolium* Aiton y algunos híbridos de *V. angustifolium* cruzados con *V. corymbosum* (**Rodríguez R. , 2021**) (**González & Morales, 2017**).

**Lostanau (2015)** indica que el arándano se ha clasificado según varios criterios, según su necesidad en horas frío, el tamaño que alcanzan estos arbustos y la época de maduración de los frutos. Según su requerimiento en horas frío, existen

variedades que necesitan estar sometidas a bajas temperaturas durante un periodo de tiempo variable para romper la dormancia, esto es, cumplir un determinado número de horas por debajo de 7°C para poder florecer (**García et al., 2018**).

“Northern Highbush” es una variedad de arándano con altos requerimientos de horas/frío, cuyo valor es >800 h/f, mientras que, “Mid Highbush” necesita entre 400 – 600 h/f, por lo que genéticamente se han creado híbridos de estas dos variedades (**Cai, Takeda, Foote, & Wasko, 2021**). Por otra parte, se encuentra la variedad “Southern Highbush” que presenta bajos requerimientos <300 h/f (**Yang, Núñez, Da Silva, Phillips, & Muñoz, 2020**). “Ventura” y “Biloxi” son variedades que no presentan requerimiento de horas frío, mismas que resultan de programas de mejora a través de hibridaciones que les permite mantener su ciclo vegetativo sin tener una parada invernal y que se cultivan sin ningún tipo de receso (**Pinedo, 2018**).

Además de mejorar la adaptación de la planta por medio de cambios genéticos, se ha mejorado las características del fruto que permitan una mejor vida postcosecha, dentro de los cuales se encuentra el almacenaje y mantenimiento del fruto fresco, por lo que las variedades más apreciadas en el mercado americano son: ‘Star’, Biloxi, Jewel, Emerald, Southmoon, Jubilee, Reveille y Legacy, mismas que se diferencian entre sí, por su tiempo de cosecha (**Salamanca & Hurtado, 2019**).

La principal producción se localiza en países del Norte, como Estados Unidos (EEUU), Canadá y México, en Europa: Polonia, España, Nueva Zelanda y Austria. Y países del Sur, como Chile, Argentina, Colombia y Perú mismos que aprovechan el beneficio de producción en contra estación (**Cai, Takeda, Foote, & Wasko, 2021**).

La situación mundial del arándano de la última década, ha determinado a EEUU y Chile como principales países líderes en el mercado del arándano. El promedio de producción del fruto es de 223 millones de kg sobre una superficie de casi 44 000 ha, seguida por Chile con una producción de 50 millones de kg en una superficie de 13 000 ha (**Almonacid, 2019**).

Ecuador en los últimos 2 años ha incrementado en un 100% el cultivo de arándanos, es un negocio que apenas inicia y por ende su exportación está en espera, su demanda es creciente y además de ser rentable a largo plazo, cuenta con amplias características nutricionales **(El Telégrafo, 2018)**.

El arándano es aprovechado en la gastronomía, en la elaboración de mermeladas o jaleas de relleno para pasteles, como ingredientes de bebidas alcohólicas y como colorante. Medicinalmente funciona en la dieta por su bajo contenido calórico, alto contenido de antioxidantes y anticancerígenos **(Morante & Cruz, 2022)**.

El consumo de arándano se ha incrementado en un 70% por las propiedades benéficas que brinda a quien las ingiere, destacando entre ellas propiedades antidiarreicas, antiinflamatorias y astringentes por su contenido de taninos, la mirtilina por ejemplo, es uno de los glucósidos de estos taninos, la cual actualmente se utiliza en oftalmología **(Gil, Rojas, García, & Carvajal, 2022)**.

Estudios realizados en Europa e Israel han revelado que este fruto mejora en la sensibilidad de la retina, aumentando la agudeza visual durante el consumo de arándano, ya que sus compuestos únicos parecen mejorar la elasticidad capilar y permeabilidad del ojo permitiendo una mejor visión durante la oscuridad y reduciendo la fatiga visual **(Reyes & Salcedo, 2017)**.

**Hajazimi, Landberg y Zamaratskaia (2016)**, evidenciaron que el arándano presenta un alto contenido de ácidos fenólicos simples y flavonoides, como antocianinas y proantocianidinas, ácidos quínico y mólico. Estas sustancias acidifican la orina de manera que ejercen un efecto antimicrobiano impidiendo la reproducción bacteriana y favoreciendo la salud de la persona. Las proantocianidinas de tipo A, son capaces de unirse a proteínas conocidas como adhesinas presentes en las fimbrias de *E. coli* (principal causante de infecciones urinarias), impidiendo así su adhesión a las paredes de la uretra y por ende su proliferación y crecimiento.

### 1.1.2. Descripción del Arándano

#### a. Taxonomía

En la actualidad se ha estimado alrededor de 400 especies del arándano que se encuentran distribuidas en toda América, prevaleciendo en mayor cantidad en América del Norte. Esta especie pertenece a la familia Ericaceae y género *Vaccinium* (Jurikova, Skrovankova, Micek, Balla, & Snopek, 2019).

La taxonomía de esta planta se detalla a continuación en la siguiente tabla:

**Tabla 1.** Taxonomía del Arándano

<b>Reino:</b>	Vegetal
<b>División:</b>	Pterophytas
<b>Subdivisión:</b>	Angiosperma
<b>Clase:</b>	Dicotiledónea
<b>Subclase:</b>	Dillenidae
<b>Orden:</b>	Ericales
<b>Familia:</b>	Ericaceae
<b>Subfamilia:</b>	Vaccinioidea
<b>Tribu:</b>	Vaccinieae
<b>Género:</b>	<i>Vaccinium</i>
<b>Especie:</b>	<i>corybosum</i>
<b>Variedad:</b>	Biloxi

**Fuente:** (Retamales & Hancock , 2018)

Biloxi es una variedad de arándanos altos del sur, que fue desarrollada en programas de mejoramiento genético por el Departamento de Agricultura del Servicio de Investigación Agrícola de EEUU, esta variedad resultó de hibridaciones interespecíficas entre especies nativas como es el arándano alto o Highbush (*V. corybosum* L.), con arándano siempre verde o ever green (*V. darrowii* Camp) y

arándano ojo de conejo o rabbit eye (*V. ashei* JM. Reade) (**Retamales & Hancock , 2018**).

## **b. Botánica**

El arándano es un arbusto de madera leñosa, que llega alcanzar en su madurez tres metros de altura. El fruto pertenece a la familia de las *berries* o bayas, que se caracterizan por su forma esférica y de diferentes colores como azules, negros y morados dependiendo de la variedad y madurez, cuyos diámetros oscilan entre 6 y 10 milímetros, mientras que, su sabor es jugoso y ligeramente ácido (**Nemeth, Lambrinos, & Strik, 2017**).

A continuación, en la siguiente tabla se detalla cada una de las partes botánicas del arándano:

**Tabla 2.** Características Botánicas del Arándano

<b>Parte del Arándano</b>	<b>Descripción</b>
<b>Raíces</b>	Se conforma por raíces finas sin la presencia de pelos absorbentes. Soportan un pH del suelo entre 4 y 5,2
<b>Ramas</b>	Conformado por una serie de ramas que se generan en las yemas de la corona, se denominan cañas con una coloración amarilla, roja o café
<b>Flores</b>	Se conforman por cinco pétalos que se unen a la corola cuya coloración oscila entre blanco y rosado, con una forma de racimo y pendular.
<b>Fruto</b>	Es una baya comestible que presenta un epicarpio de tono azul o negro cuanto está maduro. Las semillas se encuentran localizadas en la placenta frutal.
<b>Hojas</b>	Dentadas, caducas y persistentes con peciolos cortos. La coloración puede ser verde o amarillo, rojo o violeta. Depende de las estaciones del año.

**Fuente:** (Rivadeneira, 2022)

### **1.1.3. Beneficios del Arándano**

Los arándanos son frutos ricos en antocianinas, donde se estima que cuentan con un 60% de polifenoles totales. Estos compuestos se conformados por flavonoides y no flavonoides, siendo principalmente los ésteres de ácido hidroxicinámico. Las antocianinas se convierten en una gran cantidad de productos a través de eventos químicos durante el metabolismo humano (**Kalt, et al., 2020**).

De esta manera se ha evidenciado que los arándanos son muy beneficiosos para disminuir el envejecimiento, donde se genera tasas de velocidad mucho más lentas en el deterioro cognitivo. Los arándanos también se han mostrado prometedores en la neuropatología relacionada con la edad (**Campana & Williams, 2020**).

Las antocianinas presentes en el arándano tienen fuertes propiedades antioxidantes y, a menudo, se las considera responsables de la actividad biológica de estas bayas y sus beneficios potenciales para la salud humana. Sin embargo, el contenido de antocianinas puede variar según la especie en un rango de 93 a 235 mg/100 g de arándanos.

Varios estudios han indicado la presencia de hasta 15 antocianinas diferentes. Además, se ha demostrado que la etapa de maduración en la cosecha se correlaciona positivamente con el contenido de antocianinas en los arándanos, y también muestra una relación lineal con su actividad antioxidante (**Tobar , Casas, Orellana, & Petzold, 2021**).

### **1.1.4. Cultivo de Tejidos Vegetales**

La combinación de técnicas de microbiología para el cultivo de microorganismos y la totipotencialidad de las células vegetales, permiten dar origen a un organismo vegetal completamente diferenciado a partir de una sola célula, esto conlleva al desarrollo de lo que actualmente se identifica como cultivo *in vitro* o cultivo de tejidos (**Nitta, et al., 2017**).

El cultivo de tejidos vegetales se lleva a cabo a través del aislamiento de una parte de la planta, denominada inóculo o explante, la cual se somete a procesos de desinfección, y se la inocula en un medio nutritivo dentro del cual, dará formación a nuevos embriones o brotes y eventualmente una planta completa, para posteriormente ser aclimatada a su hábitat normal (**Phillips & Garda, 2019**).

**Monzón (2021)** detalló que las aplicaciones que presenta el cultivo *in vitro* son muy variadas, no obstante, la propagación rápida y masiva de las plantas es la que presenta mayor importancia. El rescate de las especies que son susceptibles a extinguirse es otra de las aplicaciones, así mismo, la generación de híbridos y semillas sintéticas con nuevas mejoras genéticas.

La principal ventaja de aplicar este método es la propagación vegetativa rápida y a gran escala, resultando un material homogéneo y sano ocupando un menor tiempo y espacio.

De esta manera la selección de una técnica apropiada para la propagación de plantas de arándano es importante. Dado que son altos los requerimientos nutricionales de esta planta, la técnica más frecuente empleada en viveros de manera tradicional ha sido la propagación a través del enraizamiento de esquejes directamente en el suelo, por cuestión de costos, recursos limitados y no poseer las instalaciones apropiadas para cultivo *in vitro*, por ende, el rendimiento que presenta es bajo en términos de desarrollo de la planta, tiempo e inocuidad (**Ruffo & Colombo, 2020**).

Por el contrario, la micropropagación *in vitro* es la técnica que facilita la producción rápida y favorable de plantas sanas, homogéneas y libre de patógenos y por lejos, mucho mejor que la técnica convencional ya mencionada (**Podwyszynska, Orlikoska, Trojaj, & Wojtania, 2022**).

#### **1.1.5. Tipos de cultivos vegetales**

Los tipos de cultivo se clasifican de acuerdo a la parte de la planta a utilizar, por ejemplo: Cultivo de plantas intactas a partir de semillas sembradas *in vitro*, cultivo de embriones a partir del embrión aislado de su semilla, cultivo *in vitro* de un órgano

aislado el cual puede ser de distintos tipos (meristemos, ápices del vástago, raíces, anteras, entre otros) (Wijerathna, Ramtekey, Ranawaka, & Bhoja, 2022) .

Estas técnicas de propagación vegetativa en el cultivo *in vitro* dan como resultado progenitores homogéneos libres de virus en el caso de ser introducidas a través de meristemos y que son genéticamente idénticas con la planta materna conservando sus líneas parentales y además permiten la inducción de variabilidad genética (Arzate, Piña, & Arroyo, 2019).

Los cultivos por segmentos nodales son una técnica de cultivo *in vitro*, que consiste en el aislamiento de una yema, junto con una porción de tallo, obteniendo un brote a partir de esta yema. La velocidad de propagación depende del número de yemas disponibles, y la edad de las ramas de la planta madre en el caso de las plantas leñosas, las mismas que luego del suficiente repicado se procede a su enraizamiento y posterior aclimatación (Yam & Arditti, 2018).

Por otra parte, se encuentran los cultivos a partir de meristemos que permiten la producción de plantas libres de virus y que permite la obtención de una gran cantidad de plántulas. Los meristemos no cuentan con ninguna contaminación por microorganismos por la cantidad de tejido vegetal que los recubre (Ojeda, 2020).

#### **1.1.6. Factores que influyen en el cultivo *in vitro***

El primer factor que influye en el cultivo *in vitro* es la genética de la planta, Lostanau (2015), aconseja utilizar plantas sanas y vigorosas como fuente de explante, incluyendo aquellas partes de la planta que se encuentra en división activa, por ejemplo las regiones meristemáticas, la juvenilidad de estas mejoran la respuesta *in vitro*. No obstante, la expresión de la constitución genética también depende de condiciones físicas y químicas que se crean *in vitro* (Cappelletti & Mezzetti, 2016).

##### **1.1.6.1. Factores Físicos**

Los factores físicos ambientales influyen tanto en el crecimiento y desarrollo *in vivo* como *in vitro* y principalmente son la luminosidad, temperatura (en función a la especie), humedad relativa y aireación (Cardoso, Sheng, & Teixeira, 2018).

**Leiva y Toapanta (2021)**, mencionaron que la temperatura y la humedad relativa son imprescindibles para el correcto desarrollo de cultivos vegetales *in vitro* dado que la humedad relativa debe encontrarse en un rango de 50 a un 80% frente al ambiente, así como también la disponibilidad suficiente de medio de cultivo los cuales tienen un efecto significativo en la etapa de multiplicación de ciertas especies de arándano (Brigitta y Legacy) influyendo así en el crecimiento y desarrollo de los explantes, formación de brotes adventicios y número de nodos por explante.

El tamaño del explante es otro factor a considerar en el cultivo *in vitro* de arándano, donde a un mayor tamaño del explante mayor es la posibilidad de inducir la proliferación de callos o la regeneración directa de órganos, existe también un tamaño mínimo de explante por debajo del cual no es fácil lograr el establecimiento del cultivo, ya que estos suelen requerir medios más complejos (**Schuchovski, SantÁnna, Marra, & Biasi, 2020**).

El pH del medio de cultivo tiene baja influencia en el desarrollo de la planta, pero significativamente en la estabilidad del medio, existe un rango entre 4,5 y 7, donde a pH más bajos o más altos que el rango pueden presentarse complicaciones como la inestabilidad de reguladores de crecimiento, vitaminas o precipitación de sales o incapacidad de absorción de iones (**Sánchez, et al., 2020**).

#### **1.1.6.2. Factores químicos**

##### **a. Medio de cultivo**

Un medio de cultivo se define como una formulación de sales inorgánicas, compuestos orgánicos, carbohidratos, vitaminas y aminoácidos, sustancias reguladoras de crecimiento y agentes de soporte y gelificación, los que son requeridos para la nutrición y manipulación de los cultivos de manera *in vitro* (**Sudheer, Praveen, Khayri, & Jain, 2022**).

Para la producción de brotes en angiospermas los medios frecuentemente más usados son Woody Plant (WPM) (Lloyd y McCown), y MS (Murashige & Skoog) (**Campos, 2019**).

Los requerimientos de nutrientes de plantas leñosas son diferentes que el que se utiliza en plantas herbáceas, en las que generalmente se emplea el medio MS (Madzikane, Gebashe, & Amoo, 2022). De esta manera, el medio de cultivo WPM (Woody Plant Medium) es el más aplicado para el cultivo de arándano, ya que cuenta con una baja concentración de sales permitiendo un desarrollo adecuado e incrementando el porcentaje de enraizamiento de brotes (Leiva & Toapanta, 2021).

Los componentes nutricionales de este medio de cultivo se detallan a continuación en la siguiente tabla:

**Tabla 3.** Composición del medio WPM (Wood Plant Medium)

<b>Macroelementos</b>	<b>mg/L</b>
Nitrato de amonio	400
Cloruro de calcio	72.5
Nitrato de calcio monohidratado	386.34
Sulfato de magnesio	180.69
Fosfato de potasio monobásico	170
Sulfato de potasio	990
<b>Microelementos</b>	
Ácido bórico	6.2
Sulfato de cobre pentahidratado	0.025
EDTA disodio dihidratado	37.3
Sulfato ferroso heptahidratado	27.8
Sulfato de manganeso	22.3
Ácido molibdico (sal de sodio)	0.213
Sulfato de zinc heptahidratado	8.6
<b>Vitaminas</b>	
Myo-inositol	100
Ácido nicotínico	0.5
Piridoxina	0.5
Tiamina	1
<b>Aminoácidos</b>	
Glicina	2

## **b. Nutrientes**

Además de carbono, hidrógeno y oxígeno, los tejidos en cultivo *in vitro* requieren una fuente constante de bioelementos esenciales para un desarrollo adecuado tales son N, P, K, Ca, Mg y S como macroelementos, Fe, Zn, B, Mn, Cu, Co, Ni, Al, Mo y I como microelementos, quienes participan en la actividad metabólica como la síntesis de clorofila y funcionamiento de cloroplastos (**Bautista, 2017**).

Los tejidos verdes *in vitro* no son suficientemente autótrofos por lo que es necesario una fuente de carbono extra (carbohidratos) como la sacarosa, glucosa, fructosa, maltosa, rafinosa, galactosa, manosa o lactosa para la generación de material vegetal (**Barcelos, 2018**).

Las vitaminas son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y el crecimiento vegetal, las más usadas son piridoxina, ácido nicotínico, vitamina E. Mientras que, los aminoácidos son una fuente adicional e inmediata de nitrógeno, mismas que actúan como agentes quelantes (**Barcelos, 2018**).

El agar (agente gelificante), que promueve al medio humedad y soporte, se emplean también poliacrilamida o el papel filtro, en medios líquidos también funciona como puente o plataforma, así como la fibra de vidrio (**Bautista, 2017**).

## **c. Reguladores de crecimiento**

Los reguladores de crecimiento son compuestos orgánicos distintos de los nutrientes, que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican de algún modo cualquier proceso fisiológico (crecimiento y desarrollo) en las plantas (**Cai, Takeda, Foote, & Wasko, 2021**).

Las auxinas como Ácido Indol Acético (AIA), Ácido Indol Butírico (AIB), Ácido 2,4 Diclorofenóxiacético (2,4 D) y Ácido Naftalén Acético (ANA), están vinculadas al alargamiento celular, expansión de tejidos, división celular, formación de raíces (en altas concentraciones induce a la formación de callo), inhibición de la formación de vástagos axilares y adventicios (**Rojas, 2019**).

Las citoquininas por otro lado promueven la división celular, organización y diferenciación de callos y estimulan su proliferación, las más comunes son: kinetina, Bencil Adenina (BA), 2 Iso-Pentil-Adenina (2iP), Zeatina y Bencil Amino Purina (BAP) (Rojas, 2019).

- **Kinetina:** fue la primera citoquina descubierta, son derivadas de la adenina que cuentan con un grupo bencilo y que presenta una serie de propiedades antioxidantes en los fibroblastos de la piel humana y en las células de los mamíferos (Bozsó & Barna, 2021).
- **Benciladenina (BA):** también conocida como 6-bencil amino purina (6-BAP), es el más utilizado para la inducción de la división celular y la diferenciación de brotes en cultivos de tejidos vegetales. Favorece el crecimiento de muchas plantas, incluida una variedad de especies de leguminosas como el caupí, el garbanzo, el frijol seco y la soya (Mangena, 2020).
- **2 Isopenteniladenina:** es una hormona natural que estimula principalmente la formación de callos y embriones de tipo somáticos (Abdolvand, Zarghami, & Salari, 2018).
- **Zeatina:** juega un papel importante en la respuesta del crecimiento celular y la incrustación de los lípidos. La suplementación con zeatina estimula los factores clave y las enzimas involucradas en el metabolismo del nitrógeno, lo que mejora el crecimiento y la división celular. Además, la suplementación con zeatina estimula la actividad de la ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa y la síntesis de proteínas, como lo demuestra el aumento de la clorofila, el crecimiento y el contenido de carbohidratos en las hojas de las plantas (Sivaramakrishnan & Incharoensakdi, 2020).

#### 1.1.7. Justificación

Leplant es una empresa dedicada al desarrollo biotecnológico de especies vegetales de interés comercial en el Ecuador. Su trabajo es mejorar la productividad, calidad y sustentabilidad agrícola. El proceso de micropropagación de arándano presentaba tasas de multiplicación de entre 1,0 y 1,2 es decir, que por cada planta introducida se obtiene un clon.

Para mejorar el proceso de producción de arándano en Leplant ha sido importante considerar que la tasa de multiplicación es un factor determinante de éxito de la técnica de micropropagación. A mayor tasa de multiplicación existe una mayor productividad (Cayo & Peralta, 2021).

Por lo tanto, el empleo de citoquinas como zeatina, Thidiazuron (TDZ) y 2 iso-pentenil-adenina (2iP) en la propagación de arándano permite incrementar la tasa de multiplicación a través de la generación de brotes (Quispe, 2019). Dadas las posibilidades de conseguir 2iP, fue el que se empleó para llevar a cabo el proyecto.

La optimización del protocolo de micropropagación *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) a partir de segmentos nodales, tiene el enfoque de mejorar el proceso de establecimiento, multiplicación y enraizamiento, aprovechando adecuadamente los recursos de la empresa, con el fin de obtener plantas con el mejor fenotipo, una propagación de material 100% libre de patógenos y con una homogeneidad genética con capacidad de producir frutos de calidad.

## **1.2. Objetivos**

### **1.2.1. Objetivo General**

Optimizar el protocolo de micropropagación *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) a partir de segmentos nodales con base en variaciones de concentraciones de fitorreguladores, volumen de medio nutritivo y densidad de explantes.

### **1.2.2. Objetivos Específicos**

- Evaluar la eficiencia de la etapa de introducción y multiplicación *in vitro* de arándano a través de porcentajes de oxidación y contaminación.

- Establecer una concentración de fitorreguladores óptima para las etapas de multiplicación y enraizamiento de arándano.
- Definir un nivel de medio de cultivo y densidad óptima para las etapas de multiplicación y enraizamiento de arándano.

## CAPÍTULO II

### METODOLOGÍA

#### 2.1. Materiales

##### 2.1.1. Materiales de Laboratorio

- Vasos de precipitación
- Lámpara de alcohol
- Probetas
- Matraces Erlenmeyer
- Tubos de ensayo
- Frascos de vidrio
- Cajas Petri
- Pinzas
- Bisturí
- Servilletas
- Plástico autoadherente
- Papel aluminio
- Mascarilla
- Cofia
- Guantes

##### 2.1.2. Equipos

- Cámara de Flujo Laminar (ISOCIDE 5237)
- Autoclave (ALL AMERICAN)
- Balanza analítica (TREE HBR103)
- Estereoscopio (BOECO)
- Plancha de agitación
- Plancha de calentamiento
- pH – metro

##### 2.1.3. Reactivos

- Macrosales, microsales y quelatos de medio para plantas leñosas Woody Plant Medium (WPM) (Tabla 1)
- Tiamina
- Glicina
- Acido nicotínico

- Piridoxina
- Myo-inocitol
- 2-iso-Pentenil-Adenina (2iP)
- Carbón Activado (CA)
- Ácido Indol Butírico (AIB)
- Alcohol 70%
- Ácido clorhídrico
- Hidróxido de sodio
- Agua destilada
- Hipoclorito de Sodio (NaClO)
- Tween 20 (Tensoactivo)
- Fungicida (Trimix cobre)

## 2.2. Métodos

### 2.2.1. Localización del sitio experimental

El estudio se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de la empresa LEPLANT (tecnología en plantas) localizado en la Av. Los Guaytambos 6-50 y la Delicia, cantón Ambato, provincia de Tungurahua.



*Figura 1.* Ubicación geográfica del laboratorio de cultivo *in vitro* Leplant. (Google Maps, 2022)

### 2.2.2. Material de estudio

El material vegetal fue proveniente del Perú, conservado en cuarentena hasta la obtención de permisos de propagación dentro de un vivero ubicado en la ciudad de

Amaguaña, en la provincia de Pichincha, cantón Quito, la especie en estudio fue arándano, variedad Biloxi (*Vaccinium corymbosum* L.), variedad híbrida que gracias a entrecruzamientos permite que se desarrolle de manera propicia en las condiciones ambientales del sector.



*Figura 2.* Plantas madre de arándano (*Vaccinium corymbosum* L. var. Biloxi), en invernadero. (Cepeda, 2022).

### **2.2.3. Selección y transporte del material vegetal**

El material fue seleccionado en base a la capacidad productiva de la planta madre, en términos de calidad de fruto y vigor de la misma. Se tomó precauciones de asepsia durante el corte de las ramas de 50 cm de longitud aproximadamente, se las envolvió en papel periódico humedecido con agua, se almacenó en un enfriador y se las transportó al laboratorio de cultivo *in vitro* Leplant.



Figura 3. Material vegetal húmedo (*Vaccinium corymbosum* L.). (Cepeda, 2022)

## 2.2.4. Etapa de Introducción *in vitro* de arándano

### 2.2.4.1. Preparación de medio WPM para plantas leñosas

Para realizar el establecimiento *in vitro* de arándano fue necesario predisponerse de cierta cantidad de tubos de ensayo en los cuales se dispuso cada segmento nodal. Para esto se preparó 1 L de medio de cultivo WPM descrito en la tabla 3, se vertió 4 ml de medio WPM en tubos de ensayo previamente desinfectados con solución de hipoclorito de sodio comercial, una vez empacados se los colocó dentro de una autoclave (ALL AMERICAN) junto con el resto de instrumentos a emplear en la introducción, así como botellas con agua para esterilizar, pinzas, bisturís, servilletas y frascos vacíos de vidrio durante 20 minutos a 120 °C y 15 psi de presión.

Tabla 4. Medio de cultivo WPM para el establecimiento *in vitro* de arándano

Reactivo	Cantidad *L
Macronutrientes	10 ml
Micronutrientes	10 ml
Quelatos	20 ml
2iP	1,5 mg/L
Myo inositol	0,1 g

Acido nicotínico	0,5 ml
Piridoxina	0,5 ml
Tiamina	1 ml
Glicina	1 ml
Sacarosa	30 g
Agar	7 g
pH	5,4

(Leplant, 2022)

#### 2.2.4.2. Prueba de introducción *in vitro* con meristemos

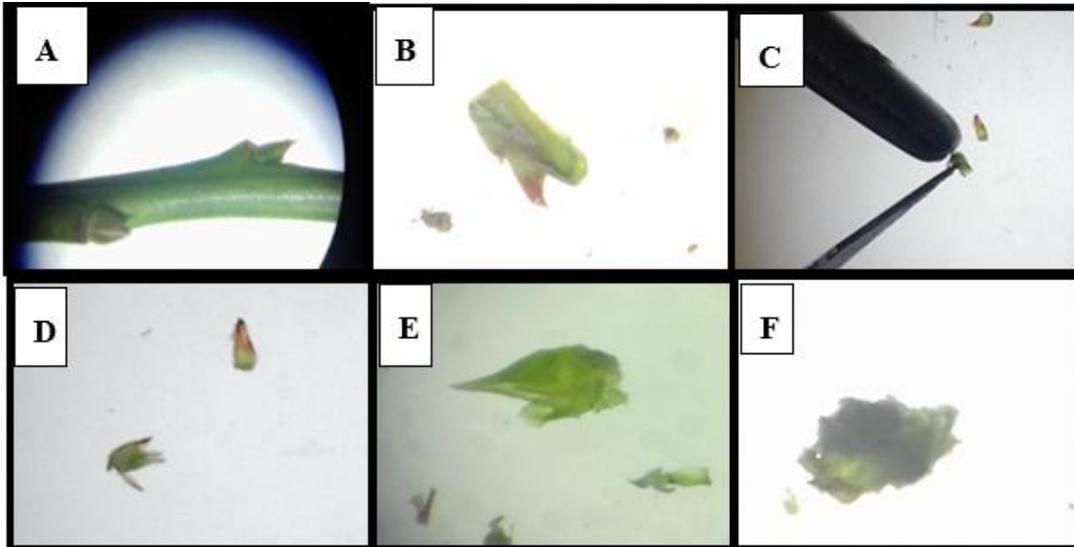
Con el objetivo de definir un inicio del experimento, y eventualmente armar el diseño experimental, se realizó una prueba de introducción, donde se aplicó protocolos de desinfección en base a métodos bibliográficos para plantas leñosas. Para esto se utilizó material vegetal fresco del que se extrajo los segmentos nodales, que posteriormente fueron desinfectados y sembrados en tubos de ensayo con medios de cultivo nutritivo.

Se inoculó 20 meristemos a partir de algunos explantes con la finalidad de comprobar la eficiencia de su reacción y desarrollo, comparando así, con 20 segmentos nodales sembrados simultáneamente ese día. Los resultados se utilizaron para evaluar el porcentaje de contaminación y oxidación inicial, eventualmente este ensayo se consideró como el tratamiento T0.

Con los resultados de contaminación y oxidación preliminares, se procedió a emplear un método de desinfección general para segmentos nodales, en el que se varió tiempos y concentraciones de los agentes desinfectantes de mayor prioridad para así efficientizar esta etapa.

La posibilidad de realizar una introducción a partir de meristemos, fue descartada, debido a que el tamaño de este tejido fue demasiado pequeño lo cual dificultó su manipulación y evaluación. Además, el tiempo de reacción en la formación de nuevos brotes se extiende a más de 45 días y se presenta también un alto porcentaje

de oxidación debido al estrés de la desinfección y el tiempo de manipulación durante su inoculación.



*Figura 4.* **A.** explante desinfectado. **B.** Porción de explante con yema axilar. **C.** Corte y descubierta de yema. **D.** Yema axilar con capas. **E.** capas meristemáticas de yema axilar. **F.** Meristemo sin capas (oxidado). (Cepeda, 2022).

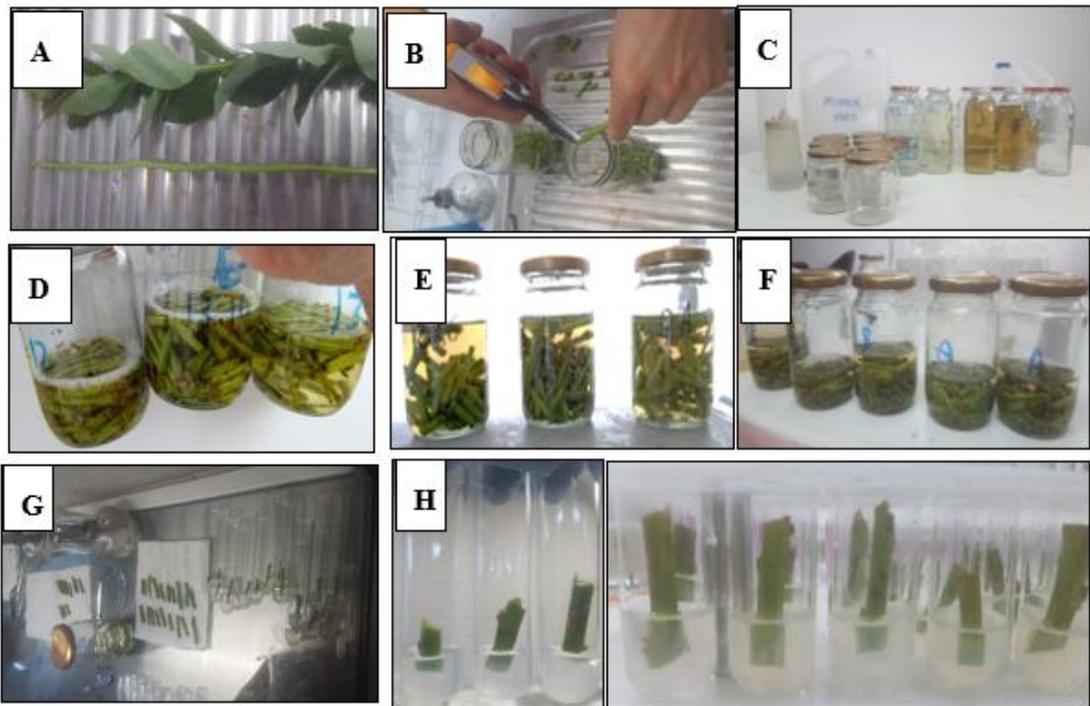
#### 2.2.4.3. Introducción *in vitro* a partir de segmentos nodales

Para la introducción *in vitro* de segmento nodales de arándano, se realizó una desinfección del material vegetal, se despojaron las hojas de las ramas cuidadosamente sin lastimar sus yemas axilares luego, se realizó un cepillado con agua y detergente en el mismo sentido del crecimiento de las yemas, después de su enjuague, se procedió a cortar segmentos nodales de entre 3 – 4 cm de longitud de tallo, los cuales fueron colocados en frascos de vidrio estériles vacíos.

Según lo establecido en la tabla 4, se colocó 50 explantes en cada frasco, se agregó solución jabonosa y se mantuvo en agitación por 20 minutos, se enjuagó con agua corriente, se agregó solución de fungicida trimix (1:100) durante 15 minutos en agitación, se enjuagó los explantes con agua estéril, se agregó solución de hipoclorito de sodio al 20% y 30% de acuerdo a cada experimento y se mantuvo en agitación por 20 y 15 minutos respectivamente. Finalmente, se enjuagó con agua estéril y se los llevó para su última desinfección con alcohol al 70% durante 3 y 1 minuto de agitación

respectivamente, se los enjuago con agua estéril y se los dejó reposar en frascos estériles vacíos para luego suspenderlos en agua estéril y así evitar su prematura oxidación.

Posteriormente, se procedió a sembrar dentro de una cámara de flujo laminar previamente desinfectada, para lo cual a cada segmento nodal se extrajo las partes oxidadas de cada extremo con un bisturí, empleando servilletas estériles para absorber el exceso de agua del segmento a sembrar, cada segmento nodal se sembró en tubos de ensayo con medio WPM del cual se mencionan su composición en la tabla 3.



*Figura 5.* A. Despojo de hojas B. Corte explantes C. Desinfectantes. D. Tratamiento con agua jabonosa. E. Tratamiento con fungicida F. Tratamiento con alcohol. G. Siembra de explantes H. Explantes sembrados en tubos. (Cepeda, 2022).

**Tabla 5.** Tratamientos de desinfección para arándano

Desinfectantes	Método A	Método B
	T1	T2
	Tiempo (min)	Tiempo (min)
Agua jabonosa	20	20
Fungicida	15	15
Hipoclorito de sodio 30% + tween	-	15
Hipoclorito de sodio 20% + tween	20	-
Alcohol 70%	3	1

(Leplant, 2022)

### 2.2.5. Etapa de propagación clonal o multiplicación *in vitro* de arándano

Estudios preliminares en la multiplicación del arándano demostró que el factor incidente en el crecimiento fue el tipo y la concentración de fitorregulador, comparándose el número de explantes iniciales con el número de explantes finales. Se evaluó la tasa de multiplicación que en un principio presentaba el arándano en las instalaciones empleando la relación:

$$\text{coeficiente de reproduccion} = \frac{\text{numero de explantes finales}}{\text{numero de explantes iniciales}}$$

Anteriormente solía emplearse 6-BAP con bajas tasas de multiplicación, para optimizar todo el proceso de la multiplicación se analizó que otros factores influían en la formación de los explantes desarrollándose así la etapa de optimización.

#### 2.2.5.1. Optimización de la etapa de multiplicación

Para la optimización de la multiplicación *in vitro* de arándano se preparó medio de cultivo WPM descrito en la tabla 4 con la respectiva concentración de fitorregulador según el diseño experimental planteado (2iP 1.5mg/ml; 2.0mg/ml; 2.5 mg/ml). Se procedió a verter en frascos de vidrio vacíos el nivel de medio de cultivo que sugirió el diseño experimental (20ml; 30ml; 40ml).

Luego de tapar cada uno, se esterilizaron conjuntamente con el resto de materiales, como bisturíes, pinzas y servilletas dentro de una autoclave (ALL AMERICAN) durante 20 min a 120°C y 15 psi de presión.

La siembra del arándano se realizó dentro de una cámara de flujo laminar (BIOBASE) previamente desinfectada, para lo cual se requirió de los explantes formados resultado de la introducción.

Se procedió a extraer los explantes de cada tubo y posteriormente a deshojar cada explante cuidadosamente sin herirlo, para evitar así la oxidación (Figura 6), de esta forma se provoca cierto estrés en el explante lo cual influye a la regeneración de hojas nuevas, así como también el crecimiento del mismo. (**Arzate, Piña, & Arroyo, 2019**)

El explante sin hojas se cortó en longitudes de aproximadamente 3 cm y se colocó sobre servilletas estériles hasta completar el número correspondiente a la densidad de explantes dentro del frasco según el diseño experimental (20 unidades; 25 unidades; 30 unidades).

Finalmente, una vez completo cada frasco con el número exacto de explantes se lo selló con papel film para evitar contaminación, El plástico film permite una adecuada transpiración de los explantes dentro del frasco, facilitando también una buena retención de humedad.

Todos los tratamientos se los conservó bajo exposición a luz fluorescente a 18 horas de luz y 6 horas de oscuridad durante 45 días, evaluando su crecimiento cada 15 días con la finalidad de contabilizar su porcentaje de crecimiento promedio en base a su longitud inicial y final de los explantes en cada frasco.

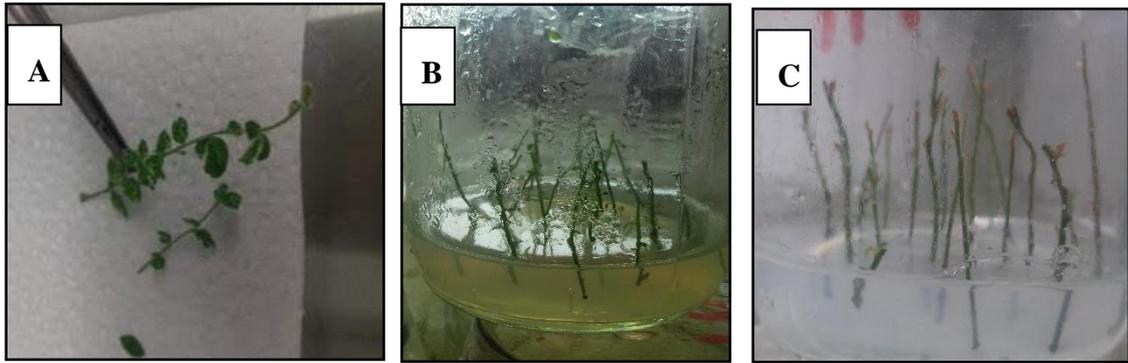


Figura 6. A. Despojo de hojas para multiplicación. B y C. Explantes sembrados de 3 cm aproximadamente. (Cepeda, 2022).

La unidad experimental para esta parte del estudio fue un explante dentro de un frasco correspondiente a un tratamiento considerando los 3 factores incidentes como fue la concentración de 2iP, nivel de medio de cultivo y densidad de explantes sembrados.

De acuerdo a las combinaciones del diseño experimental, resultaron 9 tratamientos, realizándose 3 réplicas de cada uno.

Para evaluar el porcentaje del crecimiento se trabajó con la diferencia de las longitudes iniciales y finales de los explantes a los 45 días, con lo cual se determinó el porcentaje promedio de longitud ganado y la tasa de multiplicación promedio para cada tratamiento.

Las variables dependientes correspondieron al número de brotes obtenidos por explante, el tamaño del explante crecido en centímetros para el cual se estableció un coeficiente de reproducción o crecimiento  $RC_E$  tomando como guía lo aplicado en el estudio del efecto de 24-Epibrassinolida en la micropropagación in vitro de arándano alto estudiado por **Kudryashova et al., (2012)**.

Del total de experimentos se elaboró una tabla de Análisis de Varianza (ANOVA) a partir de los porcentajes de crecimiento y la tasa de multiplicación para conocer el mejor tratamiento a emplear.

## **2.2.6. Etapa de enraizamiento *in vitro* de los explantes de arándano**

Se elaboró un diseño experimental con la finalidad de evaluar distintos tratamientos para lograr un enraizamiento del arándano *in vitro*.

Cuando un explante llega a tener raíces adventicias se puede decir que prácticamente se ha logrado obtener una vitroplanta (Sarropoilou, Dimassi, & Therios, 2014).

### **2.2.6.1. Optimización de la etapa de enraizamiento *in vitro* de arándano**

Para optimizar el enraizamiento *in vitro* de arándano se preparó medio de cultivo WPM similar al empleado en la etapa de multiplicación, con ligeras diferencias en sus componentes como las concentraciones de su fitorregulador (tabla 6): auxina AIB (1.5gm/ml; 2.0mg/ml; 2.5mg/ml) y como agente quelante Carbón Activado CA (0,3g; 0,6g; 0,8 g) según las combinaciones establecidas en el diseño experimental.

Con la ayuda de un conductímetro, se ajustó el pH del medio a  $5,7 \pm 0,02$  antes de añadir el gelificante y el carbón activado. El medio de cultivo preparado se homogenizó con ayuda de calor y se dispensó en frascos de 150 ml un volumen determinado de 40 ml para el enraizamiento. Se consideró emplear esta cantidad de medio considerando que las raíces requieren mayor espacio para su crecimiento.

Todos los frascos fueron esterilizados en una autoclave durante 20 minutos a 121 °C y 15 psi de presión.

Dentro de una cámara de flujo laminar previamente desinfectada se procedió a la siembra de los explantes en los medios preparados de acuerdo a las combinaciones establecidas en el diseño experimental.

Para esto se extrajo cada explante crecido resultado de la multiplicación, y se colocó sobre las servilletas estériles dentro de la cámara de flujo laminar, sin permitir que esta se deshidrate, se cortó en longitudes de aproximadamente 3 cm, sin retirar sus hojas y se eliminó su parte apical (parte superior del explante donde se generan

auxinas), se las sembró de acuerdo al diseño experimental (10 unidades; 15 unidades; 20 unidades;) en los medios de cultivo de enraizamiento.

El carbón activado funciona en el enraizamiento como un antioxidante absorbiendo las toxinas que afectan a la parte cortada al momento de sembrar la plántula propagada, además promueve la formación de raíces al simular la apariencia del suelo. **Luan, et al., (2021)** en su investigación sobre el efecto del carbón activado en el enraizamiento de las plantas identificaron que este compuesto proporciona un ambiente oscuro para el crecimiento de las raíces, incrementando el contenido de proteínas solubles y azúcares totales que son absorbidas por las plantas.

Finalmente, se selló con plástico film para evitar su contaminación y promover la transpiración facilitando conservar también la humedad dentro de los frascos. Se ubicó en la sala de crecimiento, cuya temperatura se mantuvo en  $20^{\circ}\text{C} \pm 3$ , con un fotoperiodo de 18 horas de luz y 6 horas de oscuridad.

## **2.3. Diseño experimental**

### **2.3.1. Etapa de desinfección**

Para la etapa de establecimiento o introducción *in vitro* de arándano, se aplicó un diseño experimental completamente al azar y a través de un análisis de varianza se determinó el mejor tratamiento de desinfección, en términos de porcentajes de contaminación y oxidación respecto a los explantes sembrados que se presentaron como viables.

La unidad experimental para la etapa de desinfección fue, un tubo con 4 ml de medio de cultivo con un respectivo segmento nodal. Se evaluaron 50 tubos por cada tratamiento con 3 réplicas.

Las variables analizadas fueron: el porcentaje de contaminación con bacteria u hongo, muerte por oxidación, potenciales oxidados y viables. Se emplearon las siguientes ecuaciones para determinar el porcentaje de cada variable.

$$\%contaminacion = \frac{\text{número de explantes contaminados}}{\text{total de explantes}} * 100$$

$$\%oxidación = \frac{\text{número de explantes oxidados}}{\text{total de explantes}} * 100$$

$$\%viabilidad = \frac{\text{número de explantes vivos}}{\text{total de explantes}} * 100$$

### **2.3.2. Etapa de multiplicación**

Para la etapa de multiplicación se aplicó un diseño cuadrados latinos debido a que se contó con muestras limitadas para realizar mayor cantidad de tratamientos, además el factor determinante e influyente en el desarrollo de los explantes fue la citoquinina 2iP, seguido del nivel de medio empleado y la densidad de explantes dentro del recipiente.

Se elaboró las combinaciones que permitieron determinar el tratamiento optimo a través de un análisis de varianza, considerando el porcentaje de crecimiento para cada tratamiento.

Los tratamientos a ensayar fueron 3 concentraciones de 2iP (1,5 mg/L; 2,0 mg/L y 2,5 mg/L 2IP) con 20 ml, 30 ml y 40 ml de volumen de medio WPM y 15, 20 y 30 explantes de arándano por frasco, las cuales se indican en la tabla 6. Por cada tratamiento se realizó 3 repeticiones.

En el DCL se formó un bloque para cada combinación de niveles de variables (volumen de medio y densidad de explantes), a estos bloques se aplicó todos los niveles del factor principal (concentración de regulador de crecimiento 2iP).

Se realizó las mediciones respectivas del tamaño inicial y final de cada explante en cada recipiente obteniendo así el porcentaje promedio de crecimiento por cada tratamiento o combinación.

**Tabla 6.** Diseño Experimental Cuadrados Latinos (etapa de multiplicación)

		I	II	III
	[2iP]	DENSIDAD EXPLANTES		
	VOLUMEN	20	25	30
	MEDIO (ml)			
1	20	<b>A - 1,5</b>	<b>B - 2,0</b>	<b>C - 2,5</b>
2	30	<b>C - 2,5</b>	<b>A - 1,5</b>	<b>B - 2,0</b>
3	40	<b>B - 2,0</b>	<b>C - 2,5</b>	<b>A - 1,5</b>

En la micropropagación *in vitro*, la unidad experimental para el DCL se definió como un frasco de 200 ml cultivado con el número determinado de vástagos previamente establecidos, en un determinado nivel de medio de cultivo WPM enriquecido con la correspondiente concentración de citoquinina (2iP).

### 2.3.3. Etapa de enraizamiento *in vitro*

Para esta etapa también se empleó un DCL como modelo experimental, se consideró el factor más influyente a la auxina AIB, seguida de la concentración del CA y la densidad de explantes, en este caso el volumen de medio no fue un factor clave porque se asumió que para la formación de raíces adventicias el espacio para su desarrollo es primordial y se estableció un volumen de 40 ml en todos los tratamientos.

Se determinó el tratamiento más óptimo a través de un análisis de varianza en base al porcentaje de enraizamiento para cada tratamiento.

El bloque del DCL se dispuso en una combinación de los niveles de las variables de concentración de Carbón Activado (0,3 g/L, 0,6 g/L y 0,8 g/L) y densidad de explantes (10, 15, 20) sometidos a los niveles del factor principal con concentraciones de 1.5 mg/l, 2,0 mg/L y 2,5 mg/L de fitorregulador AIB (Tabla 7).

**Tabla 7.** Diseño Experimental Cuadrados Latinos (etapa de enraizamiento)

		<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>
	<b>[AIB]</b>	DENSIDAD EXPLANTES		
	[CA]	10	15	20
<b>1</b>	300	<b>A - 1,5</b>	<b>B - 2,0</b>	<b>C - 2,5</b>
<b>2</b>	600	<b>C - 2,5</b>	<b>A - 1,5</b>	<b>B - 2,0</b>
<b>3</b>	800	<b>B - 2,0</b>	<b>C - 2,5</b>	<b>A - 1,5</b>

La presencia de raíz, viabilidad y contaminación fueron realizadas mediante observación y conteo del número de raíces al cabo de 45 días bajo un fotoperiodo de 24 horas con 18 horas de luz y 6 horas de oscuridad.

### **2.3. Interpretación de datos**

Los análisis estadísticos de cada diseño experimental planteado por etapas de desinfección, multiplicación y enraizamiento, permitieron identificar las condiciones idóneas para la micropropagación *in vitro* de arándano

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Análisis y Discusión de los resultados

##### 3.1.1. Ensayos Preliminares

Dentro de los ensayos preliminares realizados en la etapa de desinfección donde se utilizó segmentos nodales, se observó que múltiples explantes presentaron una gran cantidad de contaminación, ya sea por hongo, bacteria u oxidación, que implica grandes pérdidas de la materia vegetal (Figura 7).

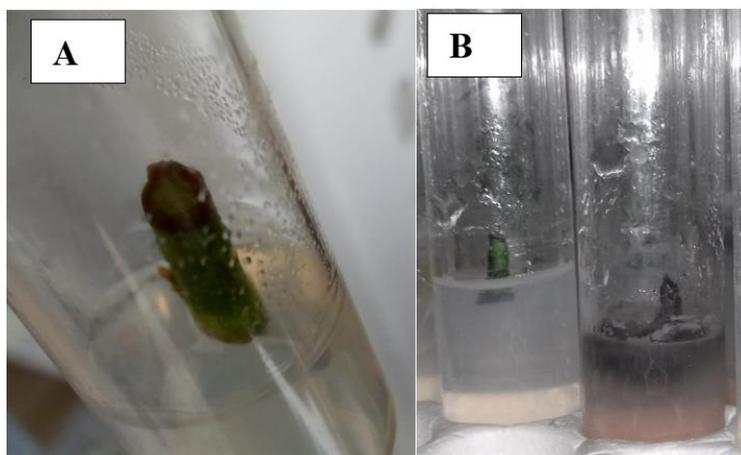


Figura 7. Contaminación de los explantes de arándano: A. Oxidación y B. Hongos en yemas de tipo axilar. (Cepeda, 2022).

La contaminación de los explantes del arándano se debe principalmente a la inadecuada manipulación de los mismos o a su vez por medio de la utilización de ciertos instrumentos que se encuentran contaminados (**Bassam, Bucxkley, & Kingsley, 2021**). De igual manera, estos resultados contrastan con los obtenidos por **Gutiérrez (2021)**, quien en la etapa de introducción utilizó la inmersión de los segmentos nodales de *Vaccinium corymbosum* en hipoclorito de sodio al 3% y determinó una contaminación por hongos y bacterias, además de oxidación.

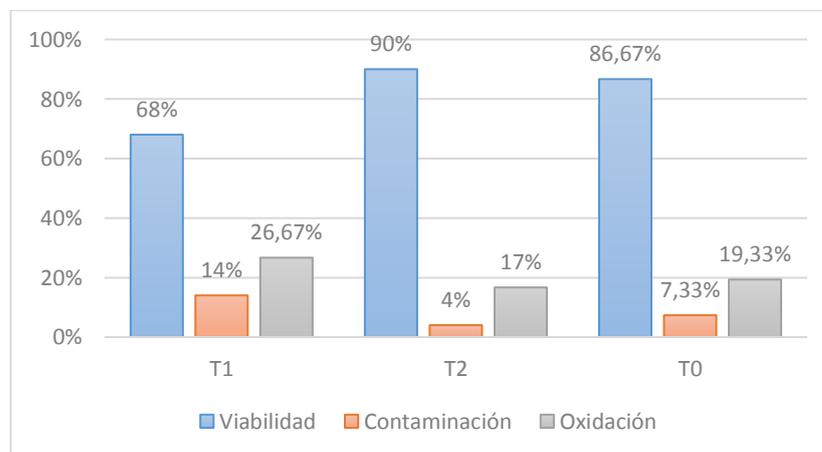
En una investigación realizada en los árboles de guayacán, se determinó que sus explantes tienden a contaminarse por hongos y bacterias debido a que muchas de

las veces este tipo de microorganismos se pueden encontrar de manera endógena, donde al estar en contacto directo con el medio de cultivo, se reproducen (**Indacochea, et al., 2018**).

Con respecto a la oxidación se ha evidenciado que es un problema que sucede principalmente en plantas leñosas, generado por la eliminación de radicales libre de múltiples componentes celulares o a su vez por la oxidación de distintos compuestos fenólicos por medio de la enzima polifenol oxidasa (PPO) (**Díaz, Rodas, Gonzalez, & Vera, 2021**).

### 3.1.2. Etapa de Desinfección de los Explantes

Como se mencionó con anterioridad, la incidencia de la contaminación afecta de manera directa al crecimiento del segmento nodal, por lo cual es de vital importancia la implementación de protocolos de desinfección que contribuyan a la eliminación de hongos y bacterias. Dentro de la presente investigación, se utilizó fungicida e hipoclorito de sodio cuyos resultados se evidencian a continuación:



*Figura 8.* Índices de contaminación, oxidación y viabilidad de cada uno de los tratamientos en la etapa de desinfección

El tratamiento 2 presentó una menor cantidad de explantes contaminados por hongos y bacterias, al igual que un menor porcentaje de oxidación, presentando mayores índices de viabilidad. Mientras que, el tratamiento 1, presentó menores

índices de viabilidad debido a que los explantes se contaminaron por hongos y bacterias, además de presentar altos índices de oxidación.

**Gutiérrez, et al., (2019)** con respecto a la micropropagación in vitro, se ha evidenciado grandes limitaciones provocada por la contaminación microbiana, principalmente las bacterias. Este tipo de contaminantes generan grandes pérdidas económicas, cuyos índices elevan si se genera una inadecuada manipulación de la parte vegetal o por falta de medios estériles.

Uno de los principales efectos negativos que producen los microorganismos contaminantes es la competencia por los nutrientes con las plantas, lo cual provoca una serie de daños que disminuyen la tasa de multiplicación, la no presencia de raíces e incluso la necrosis de la planta (**Abdolvand, Zarghami, & Salari, 2018**).

**Muller, García, Travacio y Bueno (2017)** mencionaron que es muy importante prevenir la contaminación por microorganismos en la etapa inicial del cultivo in vitro, siendo de utilidad la aplicación de ciertos desinfectantes químicos tales como: etanol, hipoclorito de sodio o calcio y bicloruro de mercurio, cuya concentración y tiempo depende del tipo de planta con la que se trabaje. Dentro de la presente investigación se tomó en consideración la contaminación provocadas por dos microorganismos principales, hongos y bacterias, cuyos resultados se detallan a continuación:

#### **3.1.2.1. Contaminación por Hongos**

Los resultados obtenidos por medio de la prueba estadística de análisis de varianza (ANOVA) para los tratamientos aplicados durante la etapa de desinfección evidencian que no existen diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). Se desarrolló una prueba de Tuckey por medio de la cual se identificó que el mejor tratamiento para obtener una menor contaminación por hongos fue el tratamiento 2 (Anexo 4-C).

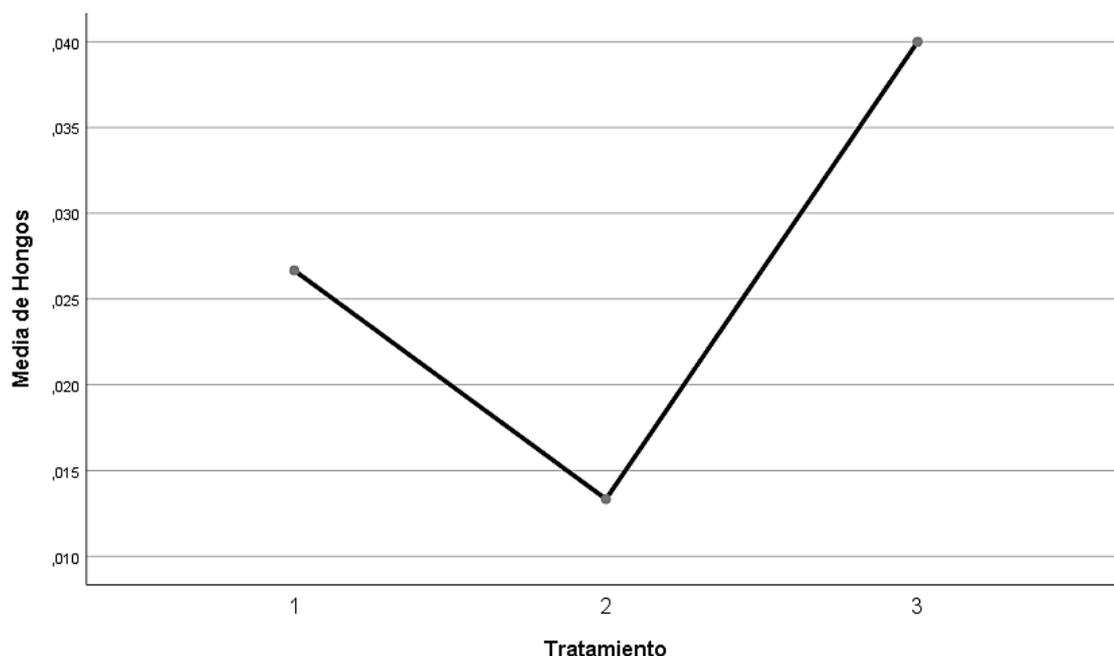


Figura 9. Distribución de medias de la variable: contaminación por hongos

La figura 9, evidencia la distribución de medias en cuanto a la variable de la contaminación por hongos. Dentro del tratamiento 3 se observa un mayor porcentaje de concentración, seguido del tratamiento 1 y 2. El mejor tratamiento para obtener menores índices de contaminación de esta variable es el número 2.

**Gutiérrez (2021)** dentro de su investigación determinó que el hipoclorito de sodio al 3%, conjuntamente con el fungicida permite la obtención de explantes con mayor asepsia. Estos resultados contrastan con los obtenidos dentro de la presente investigación debido a que se trabajó con una mezcla de bactericidas y fungicidas.

Por otra parte, **Pérez et al., (2016)** identificaron que los principales hongos contaminantes fúngicos dentro del establecimiento *in vitro* de las plantas pertenecen al género *Penicilium* y *Fusarium*, debido a que muchas de las veces las plantas contienen estos microorganismos de manera endógena que al entrar en contacto con el medio de cultivo rico en nutrientes se desarrollan fuera. Además, otro de los factores que influye en este tipo de contaminación es la falta de asepsia en el medio, debido a que muchas de las veces se encuentran esporas de los hongos.

### 3.1.2.2. Contaminación por bacterias

Los resultados obtenidos por medio de la prueba estadística de análisis de varianza (ANOVA) para los tratamientos aplicados durante la etapa de desinfección evidencian que existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). De igual manera, se desarrolló una prueba de Tuckey por medio de la cual se identificó que el mejor tratamiento para obtener una menor contaminación por bacterias es el tratamiento 2 (Anexo 5-C).

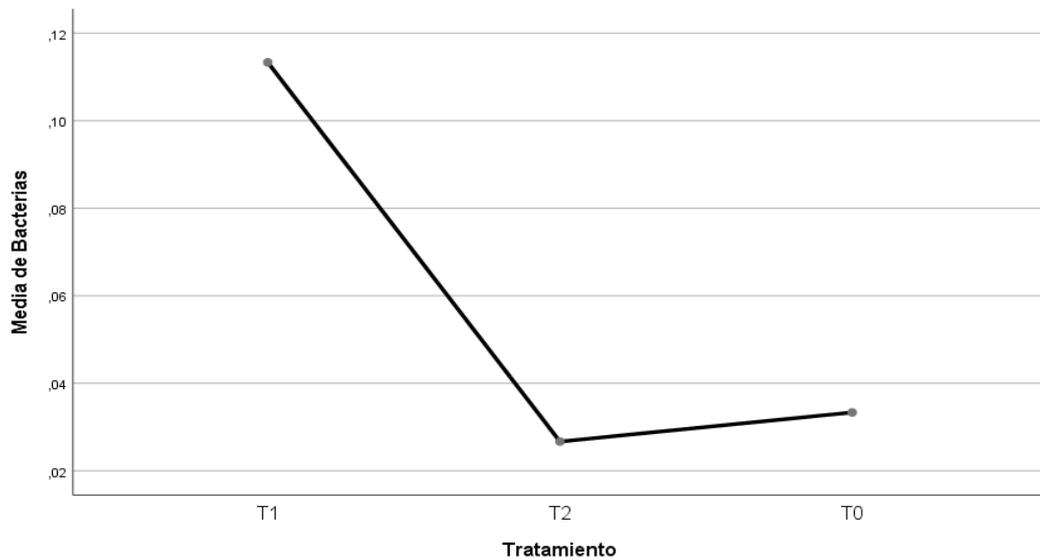


Figura 10. Distribución de medias de la variable: contaminación por bacterias

En la figura 10 se evidencia la distribución de las medias de la variable de contaminación por bacterias. El tratamiento 1 presenta una gran cantidad de contaminación, mientras que, el tratamiento 2 presenta menores concentraciones, esto indica que la concentración tanto de fungicida como hipoclorito de sodio contribuyen en una desinfección adecuada de los explantes de arándano.

**Hernández y González (2020)** mencionaron que las bacterias corresponde a uno de los contaminantes *in vitro* más comunes, lo que genera múltiples problemas donde muchas de las veces son imposibles de eliminar, siendo principalmente endógenos. Los géneros bacterianos más comunes son: *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, entre otros.

El éxito de la micropropagación depende de manera directa tanto del control como de la prevención de la contaminación bacteriana. **Gutiérrez (2021)** determinó que el hipoclorito de sodio es el desinfectante superficial con menor toxicidad y de fácil acceso que contribuye principalmente en la eliminación de bacterias.

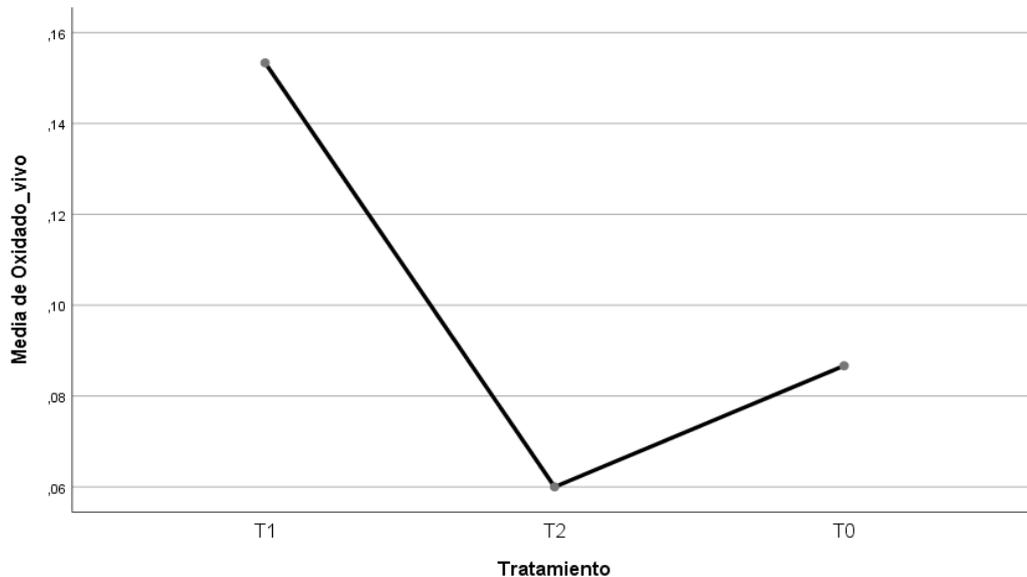
### **3.1.2.3.Oxidación**

El proceso de oxidación en los explantes de las plantas se define como una forma de oscurecer los tejidos cultivados de manera *in vitro*, debido a la presencia de radicales libres o a su vez por medio de compuestos fenólicos oxidados a través de la enzima polifenol oxidasa que causan daño e incluso la muerte de la célula (**Arzate, Piña, & Arroyo, 2019**). En la presente investigación se dividió en oxidado potencial y oxidado muerto, tal como se evidencia a continuación:

- **Oxidado Potencial**

Dentro de esta variable se evidenció que muchos de los medios de cultivo tomaron un color rojizo y negro en la parte inferior y superior del explante, siendo indicios de la cicatrización del tejido vegetal, no obstante, producen células del explante viables, siendo estas las yemas axilares desarrolladas.

Los resultados obtenidos por medio de la prueba estadística de análisis de varianza (ANOVA) para los tratamientos aplicados durante la etapa de desinfección evidencian que existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Se desarrolló una prueba de Tuckey por medio de la cual se identificó que el mejor tratamiento para obtener una menor cantidad de explantes con oxidado potencial es el tratamiento 2 (Anexo 6-C).



*Figura 11.* Distribución de medias de la variable: oxidado potencial

La figura evidencia como se distribuyen las medias de la variable del oxidado potencial dentro de la etapa de desinfección. Se observa que, el tratamiento 1 presento mayor cantidad de medios de cultivo con oxidación, mientras que, el tratamiento 2 presento menores cantidades.

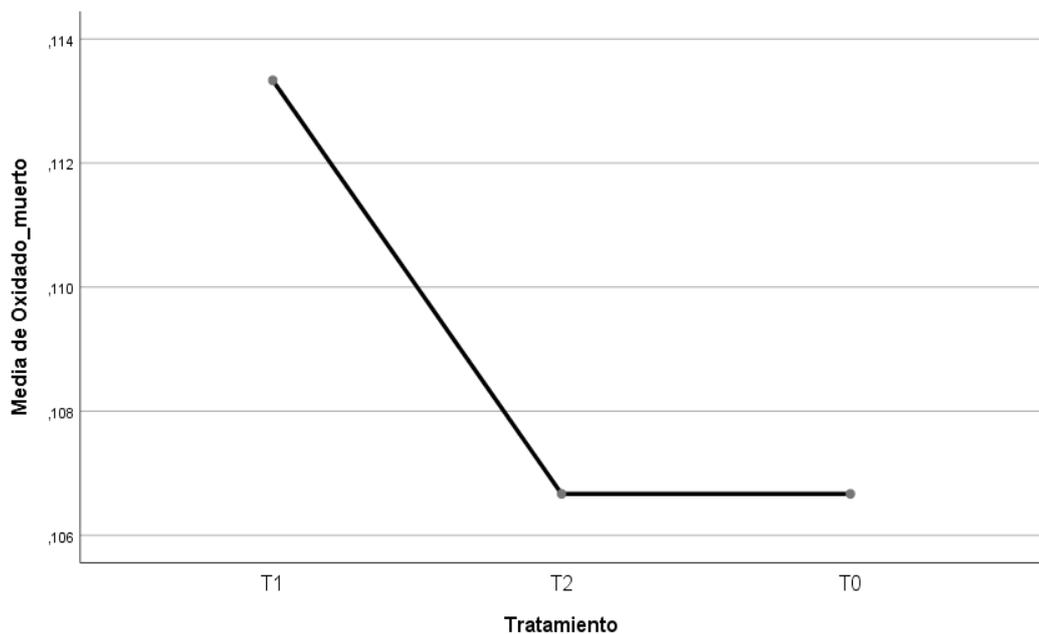
Por medio de la medición de esta variable se identificó que el tejido vegetal sufrió una serie de lesiones durante esta etapa debido a que cada uno de los agentes presenta efectos dañinos para las células. Por lo que es muy importante tanto el control de la concentración y el tiempo de exposición, con el fin de evitar este tipo de lesiones (**Flores, 2017**).

Una de las recomendaciones para evitar este tipo de problema en los cultivos vegetales es el uso de agentes antioxidantes en las etapas iniciales con el fin de reducir la oxidación en un gran porcentaje (**Gutiérrez, et al., 2021**).

Generalmente, los agentes antioxidantes son una serie de compuestos químicos que cuentan con la capacidad de interactuar con los radicales libres evitando siempre causar daño a los cultivos vegetales (**Díaz, Rodas, Gonzalez, & Vera, 2021**).

- **Oxidado Muerto**

Dentro de esta variable se observó que los explantes al presentar oxidación murieron, donde fue imposible la formación de un nuevo brote. Los resultados obtenidos por medio de la prueba estadística de análisis de varianza (ANOVA) para los tratamientos aplicados durante la etapa de desinfección evidencian que no existen diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). De igual manera, se desarrolló una prueba de Tuckey por medio de la cual se identificó que el mejor tratamiento para obtener una menor cantidad de explantes con muerte por oxidación es el tratamiento 2 (Anexo 7-C).



*Figura 12.* Distribución de medias de la variable: oxidado muerto

La figura evidencia la distribución de las medias en cuanto a la presencia de explantes oxidados muertos. Se observa que el tratamiento 1 presenta una mayor cantidad de oxidados muertos, mientras que el tratamiento 2 se presenta en una menor cantidad por lo que se lo puede utilizar como el mejor tratamiento.

Una de las alternativas para evitar la oxidación y necrosis de los explantes es el uso de medios líquidos debido a que frecuentemente los fenoles se diluyen más rápido en este tipo de medio, por lo que afecta en menor proporción a estos explantes.

Esto promueve un establecimiento con mayor facilidad, con mayores índices de eficiencia y rentabilidad, de igual manera disminuye los costos de inversión al disminuir el agente solidificante (Jiménez & Abdelnour, 2018).

### 3.1.2.4. Viabilidad

Esta variable presenta gran interés debido a que evidencia si se generan nuevos brotes que son útiles para las siguientes etapas del proceso de micropropagación. Los resultados obtenidos por medio de la prueba estadística de análisis de varianza (ANOVA) para los tratamientos aplicados durante la etapa de desinfección evidencian que existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). De igual manera, se desarrolló una prueba de Tuckey por medio de la cual se identificó que el mejor tratamiento para obtener una menor cantidad de explantes muertos por oxidación y con mayor índice de viabilidad es el tratamiento 2 (Anexo 9-C).

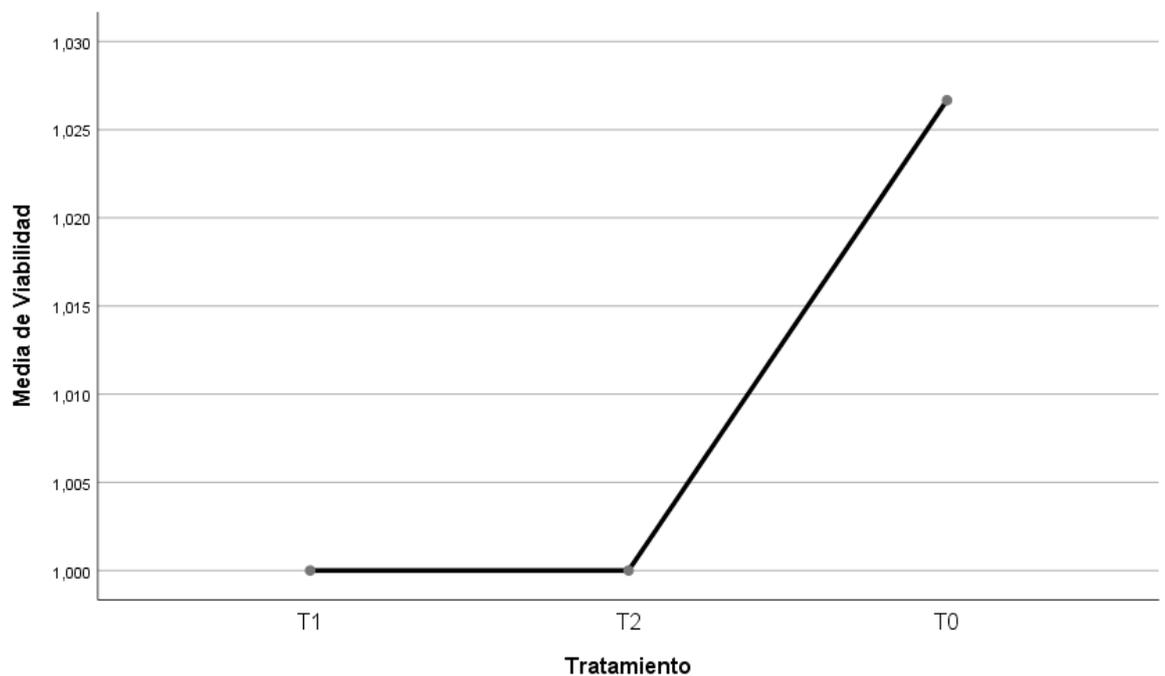


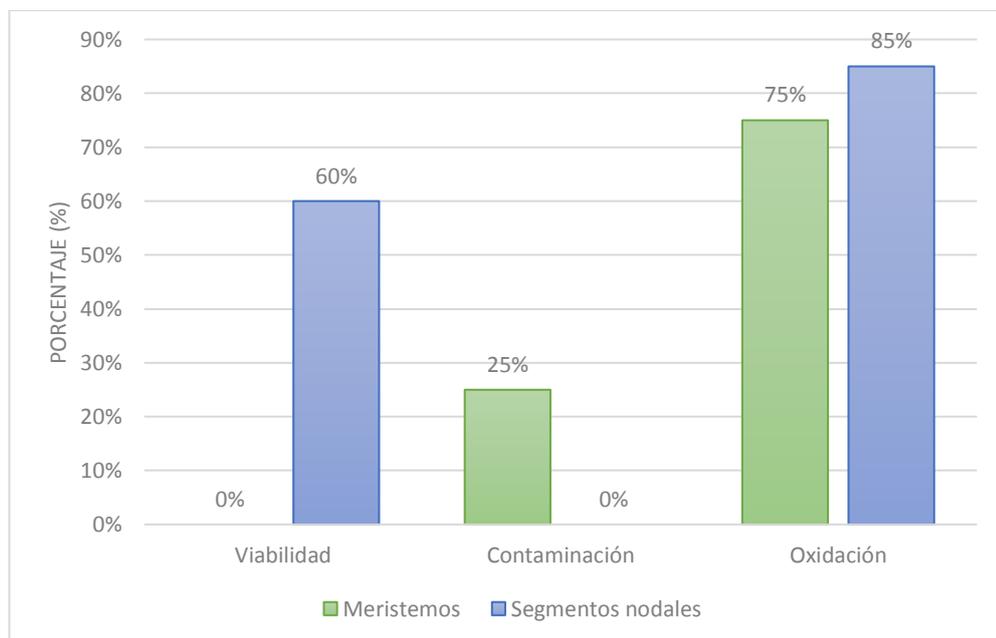
Figura 13. Distribución de medias de la variable: viabilidad de explantes

La figura 13 evidencia la distribución que presentan las medias en cuanto a la variable de la viabilidad de los explantes. El tratamiento 0 presentó una mayor viabilidad, no obstante, los otros tratamientos también presentan altos índices de viabilidad.

Debido a que el tratamiento 2 presentó una menor cantidad de explantes con contaminación de hongos y bacterias, oxidación potencial y oxidación con necrosis, fue considerado como el mejor tratamiento para la etapa de desinfección y por ende el que fue empleado para el desarrollo del protocolo de micropropagación.

### 3.1.3. Etapa de Introducción de los Explantes

Una vez determinado que el tratamiento 2 fue el mejor durante la etapa de desinfección, se continuó con la evaluación del cultivo en la etapa de introducción, donde se conservó los análisis tanto de contaminación como oxidación y viabilidad. Para esta etapa se utilizó meristemos y segmentos nodales con el fin de identificar su viabilidad, cuyos resultados se evidencian a continuación:



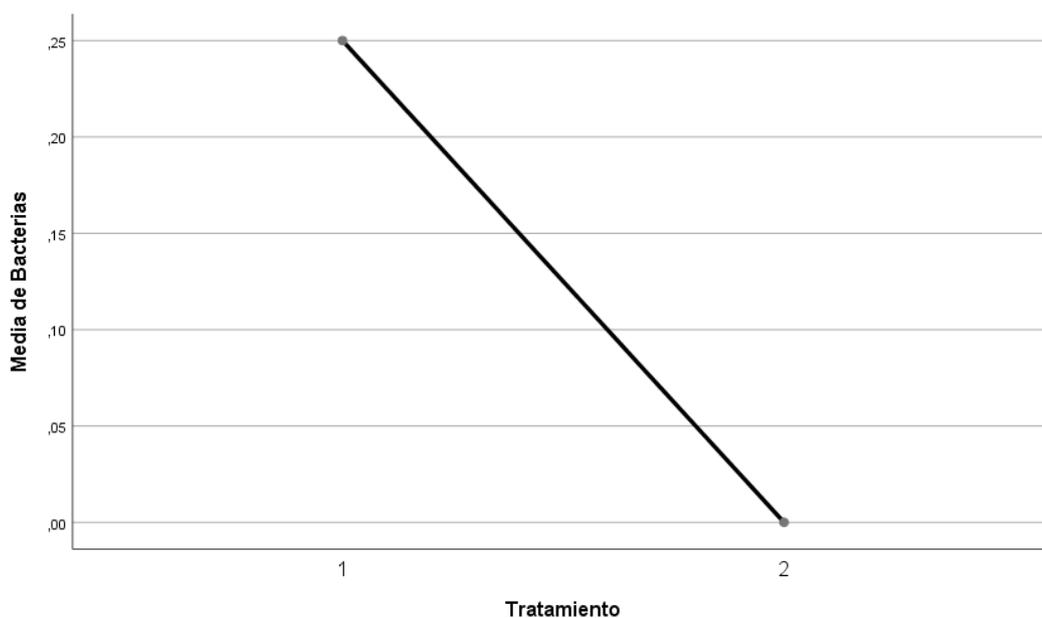
*Figura 14.* Índices de contaminación, oxidación y viabilidad de cada uno de los tratamientos en la etapa de introducción.

### 3.1.3.1. Contaminación por Hongos

En la etapa de introducción no se evidenció contaminación por hongos, debido a que se trabajó con medios de cultivo que fueron esterilizados previamente, además de cuidar que el medio ambiente de siembra se haya encontrado totalmente estéril.

### 3.1.3.2. Contaminación por bacterias

Los resultados obtenidos por medio de la prueba estadística de análisis de varianza (ANOVA) para los tratamientos aplicados (meristemos y segmentos nodales) durante la etapa de introducción evidencian que existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). No obstante, no se pudo desarrollar una prueba de Tuckey debido a que solo se presentan dos tratamientos (Anexo 10-C).



*Figura 15.* Distribución de medias de la variable: contaminación por bacterias, fase de introducción

La figura 15 evidencia la distribución de medias de la variable de contaminación por bacterias en la etapa de introducción. Se observa que en la introducción a través de meristemos existió contaminación por este tipo de microorganismos, mientras que, el de segmentos nodales no presentó.

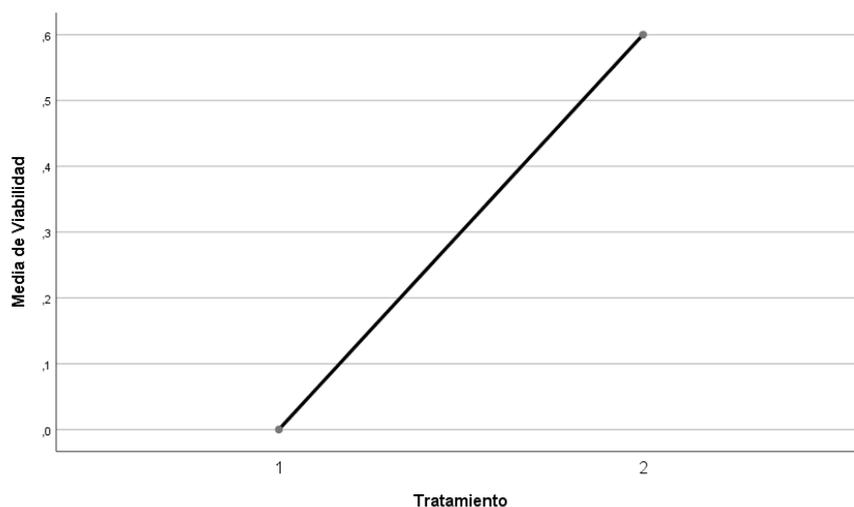
**Guaman, (2018)** indica que las células meristemáticas se encuentran en continua división, por ende, tienden a ser más vulnerables a la oxidación al ser expuestos al ambiente, aunque carecen de contaminación endógena pueden contaminarse por manipulación.

La posibilidad de emplear meristemas como inóculo se descartó, debido a su complicada manipulación para su extracción ya que presentaba un tamaño demasiado pequeño. Es por ello que el tiempo durante la extracción aumentó las probabilidades de contaminación, así como las de oxidación.

De esta manera, se identifica que el tratamiento dos (siembra de segmentos nodales) es el mejor para obtener una concentración de bacterias igual a cero.

### 3.1.3.3. Viabilidad de Explantes

Los resultados obtenidos por medio de la prueba estadística de análisis de varianza (ANOVA) para los tratamientos aplicados (meristemas y segmentos nodales) durante la etapa de introducción evidencian que existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). No obstante, no se pudo desarrollar una prueba de Tuckey debido a que solo se presentan dos tratamientos (Anexo 11-C).



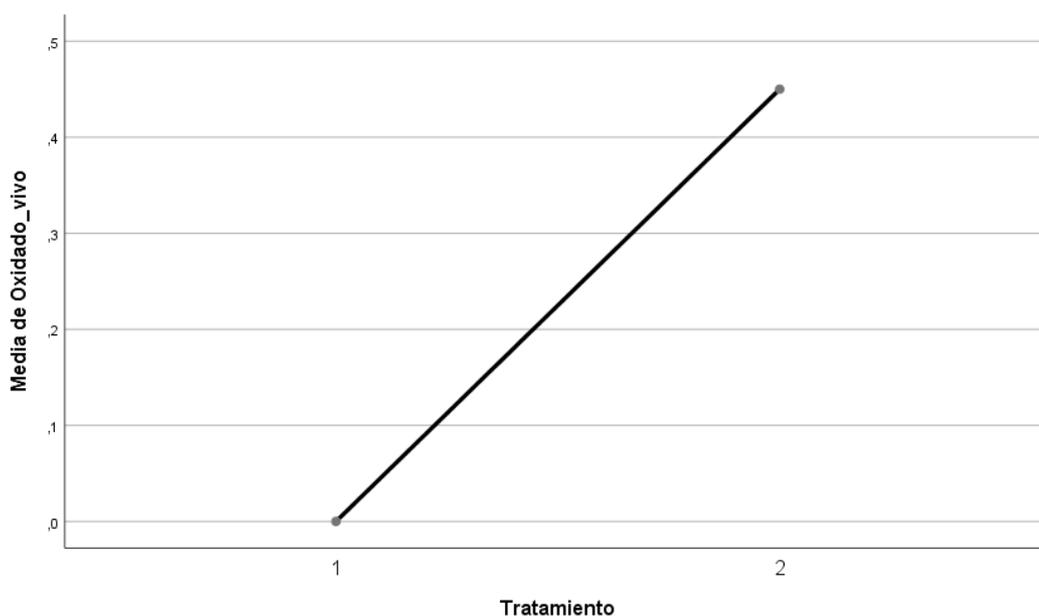
*Figura 16.* Distribución de medias de la variable: viabilidad de crecimiento, fase de introducción

La figura 16 evidencia la distribución de medias de la variable de viabilidad de crecimiento en la etapa de introducción. Se observa que en la introducción de meristemos no existió viabilidad, mientras que, el de segmentos nodales si presentó un valor alto. De esta manera, se identifica que el tratamiento dos (siembra de segmentos nodales) es el mejor para obtener una mayor viabilidad de los explantes.

#### 3.1.3.4. Oxidación de los Explantes

- **Oxidado potencial**

Los resultados obtenidos por medio de la prueba estadística de análisis de varianza (ANOVA) para los tratamientos aplicados (meristemos y segmentos nodales) durante la etapa de introducción evidencian que existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). No obstante, no se pudo desarrollar una prueba de Tuckey debido a que solo se presentan dos tratamientos (Anexo 12-C).



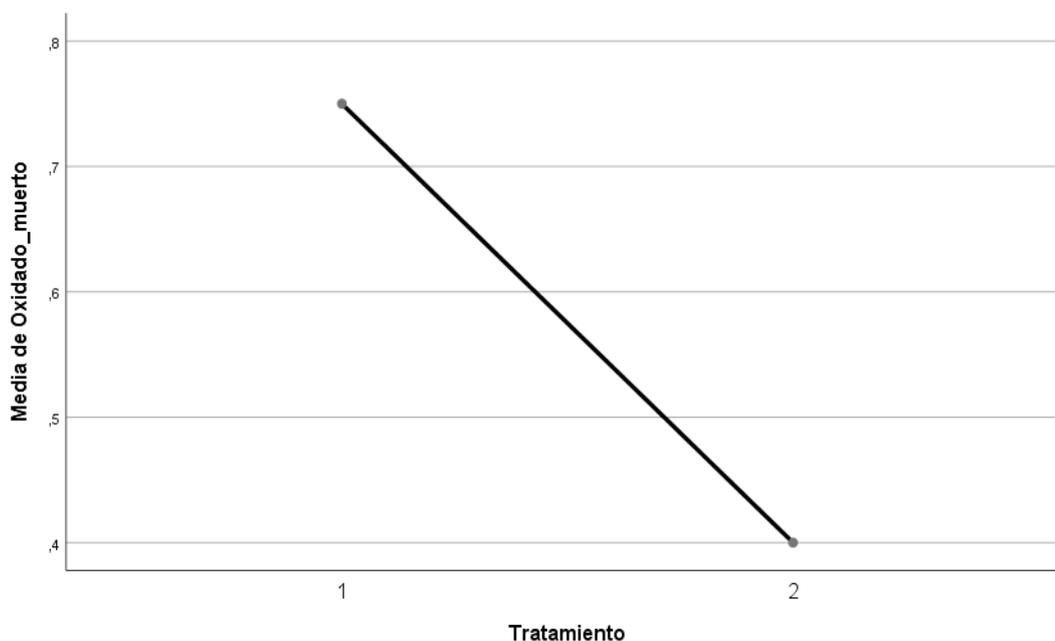
*Figura 17.* Distribución de medias de la variable: oxidado potencial, fase de introducción

La figura 17 evidencia la distribución de medias de la variable oxidado potencial en la etapa de introducción. Se observa que en la introducción de meristemos no existió oxidado potencial, mientras que, el de segmentos nodales si presentó.

De esta manera, se identifica que el tratamiento dos (siembra de segmentos nodales) es el mejor para obtener una mayor cantidad de explantes oxidados pero viables.

- **Oxidado muerto**

Los resultados obtenidos por medio de la prueba estadística de análisis de varianza (ANOVA) para los tratamientos aplicados (meristemas y segmentos nodales) durante la etapa de introducción evidencian que existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). No obstante, no se pudo desarrollar una prueba de Tuckey debido a que solo se presentan dos tratamientos (Anexo 13-C).



*Figura 18.* Distribución de medias de la variable: oxidado potencial, fase de introducción

La figura evidencia la distribución de medias de la variable oxidado muerto en la etapa de introducción. Se observa que en la introducción de meristemas existió un alto índice de mortalidad, mientras que, en los segmentos nodales no presentó ningún explante muerto por oxidación.

De esta manera, se identifica que el tratamiento dos (siembra de segmentos nodales) es el mejor para obtener una mayor viabilidad de los explantes.

Por medio de la etapa de introducción se determinó que el mejor tratamiento es el número 2 que corresponde a la utilización de segmentos nodales, debido a que presenta una contaminación y oxidación casi nula, y una alta viabilidad de los explantes. Los explantes nuevos y limpios se los empleó en la etapa de multiplicación dado que presentaron alturas de entre 4 y 6 cm.

#### **3.1.4. Etapa de Multiplicación**

Por medio de la etapa de multiplicación se incrementa el número de brotes de los explantes sembrados, con el fin de continuar con la micropropagación. Dentro de esta etapa es muy importante que se tome en consideración las siguientes variables: medios de cultivo, reguladores de crecimiento y las condiciones de cultivo (**Ramírez, et al., 2021**). Dentro de la presente investigación se empleó el índice de crecimiento, utilizando 9 combinaciones de un factor de crecimiento.

Los resultados obtenidos por medio de la prueba estadística de análisis de varianza (ANOVA) para los tratamientos aplicados durante la etapa de multiplicación evidencian que no existen diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). De igual manera, se aplicó una prueba de Tuckey por medio de la cual se identificó que el tratamiento 8 evidencia el mayor porcentaje de crecimiento de las plántulas de arándano (Anexo 14-C).

La figura 19 evidencia como se distribuyen las medias del porcentaje de crecimiento de las plántulas de arándano durante la etapa de multiplicación. Se observa que el tratamiento 2 presentó el menor porcentaje de crecimiento, mientras que, el tratamiento 8 evidencia el mayor porcentaje.

El crecimiento de las plántulas se debió principalmente a la hormona 2 isopentenil adenina. Múltiples estudios han identificado que esta hormona son muy útiles

para generar la división celular y por ende favorecer el crecimiento de cultivo de tejidos vegetales (Bielach, Hrtyany, & Tognetti, 2017).

Las citoquininas regulan numerosos procesos de desarrollo, incluida la proliferación y diferenciación celular, y varios aspectos del crecimiento de brotes y raíces, así como las respuestas al estrés biótico y abiótico (Romanov, Lomin, & Schmulling, 2018).

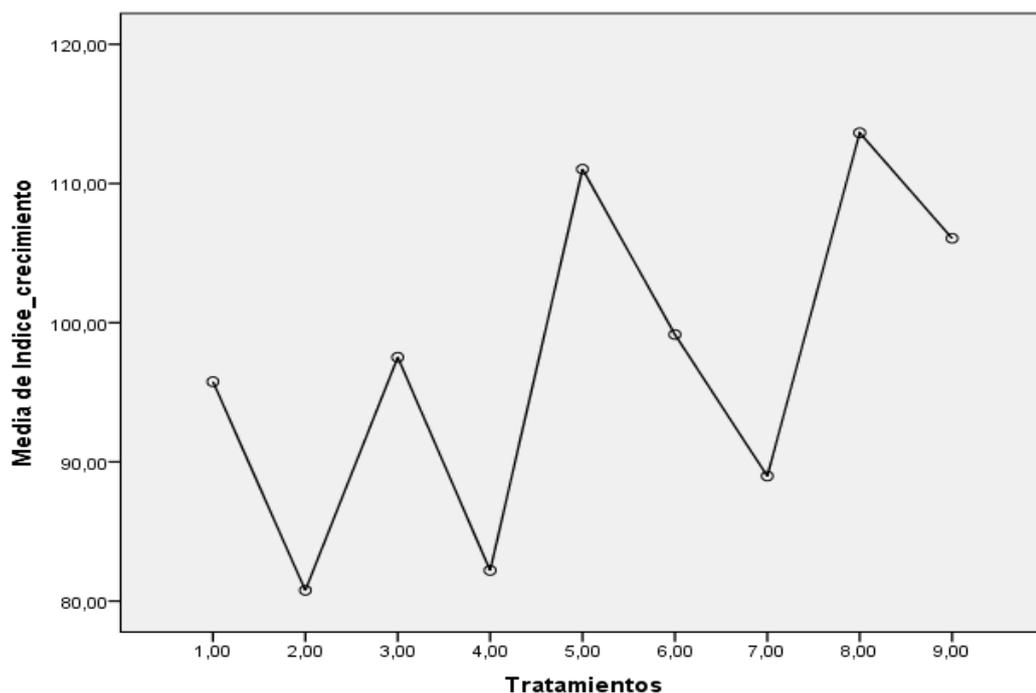


Figura 19. Distribución de medias de la variable: porcentaje de crecimiento de las plántulas, fase de multiplicación

Por otra parte, se encuentran los resultados expuestos por Cantos, Pinargote y Palma (2018) donde utilizaron la hormona citoquinina en el crecimiento y propagación del café. Determinaron un índice de crecimiento del 98,5%. Resultados que se relacionan con los obtenidos dentro de la presente investigación.

### 3.1.5. Etapa de Enraizamiento

Los resultados obtenidos por medio de la prueba estadística de análisis de varianza (ANOVA) para los tratamientos aplicados durante la etapa de enraizamiento evidencian que existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). De igual manera, se aplicó

una prueba de Tuckey por medio de la cual se identificó que el tratamiento 6 evidencia el mayor porcentaje de enraizamiento de las plántulas de arándano (Anexo 15-C).

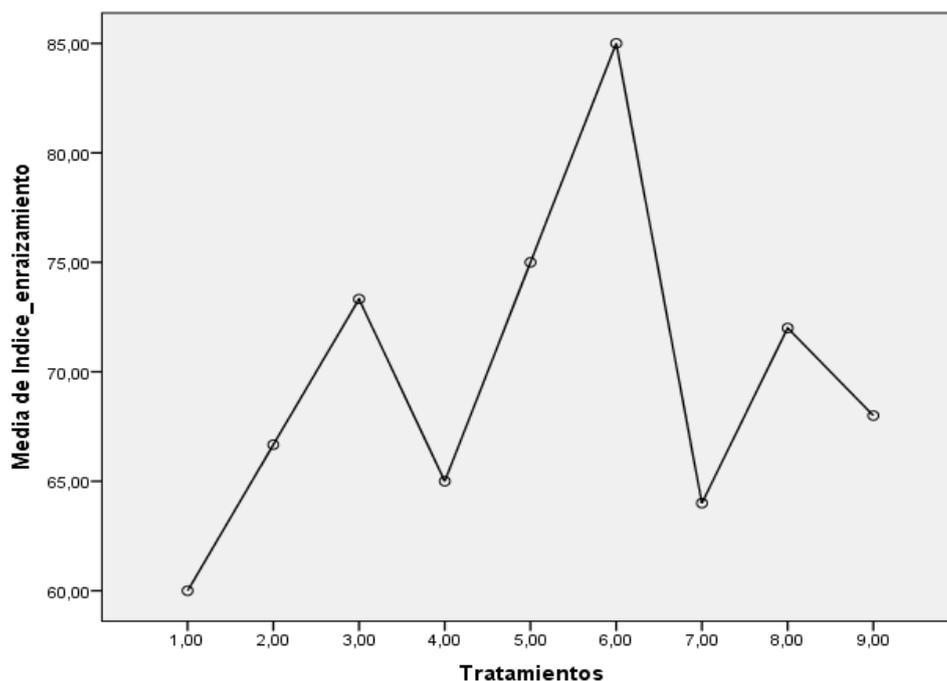


Figura 20. Distribución de medias de la variable: porcentaje de enraizamiento de las plántulas, fase de multiplicación

La figura evidencia como se distribuyen las medias del porcentaje de enraizamiento de las plántulas de arándano. Se observa que el tratamiento 1 presentó el menor porcentaje de presencia de raíz, mientras que, el tratamiento 6 evidencia el mayor porcentaje.

El crecimiento de las raíces se debe gracias a la acción principalmente del ácido indol-butírico. Esta fitohormona es el principal promotor de la generación de nuevas raíces debido a que favorecen en la división y crecimiento celular, atrayendo nutrientes y sustancias (Vélez, 2021).

El porcentaje de enraizamiento obtenido dentro de la presente investigación presenta una relación con el estudio de Pérez (2018) quien aplicó AIB en el crecimiento de las raíces de guanábana. Se determinó que con una concentración igual a 2000 microgramos de fitohormona por cada mililitro de medio se obtuvo un

porcentaje de enraizamiento igual a 99,33%. De igual manera, se encuentra el estudio realizado por **Casas (2022)** quien determinó el efecto del AIB en el enraizamiento de estaquillas de eucalipto determinando un porcentaje de enraizamiento igual al 95%.

## CAPÍTULO IV

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 3.2. Conclusiones

- Se optimizó el protocolo de micropropagación *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) a partir de segmentos nodales con base en variaciones de concentraciones de fitorreguladores, volumen de medio nutritivo y densidad de explantes. Se definió concentraciones de antioxidantes y agentes antimicrobianos en la etapa de desinfección, el uso de segmentos nodales en la etapa de introducción y la adecuada concentración de citoquina 2iP y auxina AIB para la etapa de multiplicación y enraizamiento respectivamente.
- Se evaluó la eficiencia de la etapa de introducción y multiplicación *in vitro* de arándano a través de porcentajes de oxidación y contaminación. Se determinó que en la etapa de introducción en la siembra de segmentos nodales presentó el 60% de viabilidad, 0% de contaminación por hongos y bacterias y el 85% de oxidación potencial. Mientras que, en la etapa de multiplicación se obtuvo un índice de crecimiento del 113%, cuyo mejor tratamiento fue el número 8.
- Se estableció una concentración de fitorreguladores óptima para las etapas de multiplicación y enraizamiento de arándano. Para la etapa de multiplicación se obtuvo el mayor índice de crecimiento con el uso de 2,0 miligramos/litro de 2iP. Mientras que, para la etapa de enraizamiento se obtuvo el mayor índice a una concentración de 2,5 mg/L de ácido indolbutírico.
- Se definió un nivel de medio de cultivo y densidad óptima para las etapas de multiplicación y enraizamiento de arándano. Para la etapa de multiplicación se obtuvo el mayor índice de crecimiento con el uso de 30 mililitros de medio de

cultivo y densidad de los explantes igual a 30. Mientras que, para la etapa de enraizamiento se obtuvo el mayor índice a una concentración de 800 mg/ L de Carbón activado y densidad de explantes igual a 20.

### **3.3. Recomendaciones**

Una vez culminada la presente investigación se llegó a las siguientes recomendaciones para mejorar el protocolo de micropropagación del arándano:

- Se recomienda, en la etapa de desinfección la limpieza adecuada de las ramas de arándano con el fin de eliminar cualquier indicio de partícula y por ende disminuir los índices de contaminación por hongos.
- Para los segmentos nodales se puede emplear cepillos de cerdas suaves que permiten remover las partículas de polvo de los entrenudos, donde se encuentran las yemas axilares.
- Para una desinfección más precisa se recomienda no recolectar el material vegetal durante o después de la presencia de lluvia ya que aumenta las probabilidades de contaminación por hongos y bacterias.
- Una vez enraizados los nuevos explantes, se recomienda el desarrollo de pruebas microbiológicas con el fin de que estos se encuentren libres de patógenos, principalmente de hongos y bacterias.
- Se recomienda al grupo LePlant la aplicación del presente protocolo de micropropagación del arándano con el fin de que puedan obtener explantes con mayores índices de viabilidad.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdolvand, B., Zarghami, R., & Salari, A. (2018). THE EFFECTS OF AGNO<sub>3</sub> AND 2iP (N<sub>6</sub> STAGES OF SOMATIC EMBRYOGENESIS IN DATE PALM (PHOENIX DACTYLIFERA L.) (CV. MEDJOO). *ELSEVIER*, 50(2), 495-502.
- Almonacid, F. (2019). El sur de Chile como parte de cadenas globales de valor, 1985-2016: economía regional y producción de arándanos. *Revista de Estudios sobre Despoblación y Desarrollo Rural*, 1(25), 131-158. Obtenido de <https://www.redalyc.org/journal/296/29659259005/29659259005.pdf>
- Arzate, A., Piña, J., & Arroyo, H. (2019). *Apuntes de genética vegetal*. Obtenido de <http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/104554/Apuntes%20de%20gen%C3%A9tica%20vegetal.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Barcelos, M. (2018). *Bioprospeção de microrganismos de frutas brasileiras para a produção de exopolissacarídeos*. Universidad Federal Dos Vales Do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina.
- Bassam, A., Bucxkley, S., & Kingsley, D. (2021). Eficacia del gas de dióxido de cloro contra el virus de la hepatitis A en arándanos, moras, frambuesas y fresas. *SpringerLink*, 13(1), 241-247. Obtenido de <https://link.springer.com/article/10.1007/s12560-021-09465-1>
- Bautista, J. (2017). Colonización por micorrizas en la producción de plántulas en vivero de arándano (*Vaccinium* spp.) cv Biloxi. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(3), 695-703. Obtenido de [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-09342017000300695&script=sci\\_abstract&tlng=pt](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-09342017000300695&script=sci_abstract&tlng=pt)
- Bielach, A., Hrtyany, M., & Tognetti, V. (2017). Plantas bajo estrés: participación de auxinas y citoquininas. *MDPI*, 18(7).

- Bozsó, Z., & Barna, B. (2021). Efecto diverso de dos citoquininas, kinetina y benciladenina, sobre el desarrollo de las plantas, la tolerancia al estrés biótico y la expresión génica. *MDPI*, *11*(12). doi:<https://doi.org/10.3390/life11121404>
- Bustillo, A. (2018). *El cultivo de arándano (Vaccinium corymbosum) y su proyección en Colombia*. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, Medellín. Obtenido de <https://repository.udca.edu.co/bitstream/handle/11158/940/UNIVERSIDAD%20DE%20CIENCIAS%20APLICADAS%20Y%20AMBIENTALES%20e%20ntregar%201.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Cai, Y., Takeda, F., Foote, B., & Wasko, L. (2021). Efectos del intervalo entre la cosecha y la máquina en la calidad de la fruta del arándano Northern Highbush de mercado fresco. *MDPI*, *7*(8), 245-451. Obtenido de <https://www.mdpi.com/2311-7524/7/8/245>
- Campana, I., & Williams, C. (2020). Beneficios del arándano para la función cognitiva a lo largo de la vida. *Taylor Francis Online*, *2*(1), 650-652. Obtenido de <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09637486.2020.1852192>
- Campos, J. (2019). *Propagación in vitro de Swietenia macrophylla King utilizando ácido Naftalenacético (ANA) y Bencilaminopurina (BAP)*. Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo.
- Cantos, G., Pinargote, J., & Palma, R. (2018). Influencia de la fitohormona kinetina en el crecimiento de plántulas de coffea arábica L. injertadas sobre patrón robusta en vivero. *Revista Cubana de Ciencias Forestales*, *6*(2). Obtenido de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2310-34692018000200134](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2310-34692018000200134)
- Cappelletti, R., & Mezzetti, B. (2016). DZ, 2iP and zeatin in blueberry (*Vaccinium corymbosum* L. 'Duke') in vitro proliferation and organogenesis. *Acta Horticulturae*, *11*(17), 321-324. doi:<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2016.1117.52>

- Cardoso, J., Sheng, L., & Teixeira, J. (2018). Micropropagation in the Twenty-First Century. *SpringerLink*, 17-46.
- Casas, S. (2022). *Efecto del ácido indolbutírico en el enraizamiento de estaquillas de eucalipto en Perú*. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima.
- Cayo, N., & Peralta, E. (2021). *Propagación in vitro del cultivo de arándano (Vaccinium corymbosum l) en el Cantón Cevallos Provincia Tungurahua*. Universidad Técnica de Cotopaxi, Latacunga. Obtenido de <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/7298>
- Ciaurelli, S., Origlia, C., Adán, A., Giannatassio, S., Gonzalez, M., Quinto, L., & Biava, M. (2021). Cambio de paradigma: una descripción general de la nutrigénica y la nutrigénica. *Preprints*, 11(1), 36-57. Retrieved from <https://www.preprints.org/manuscript/202107.0137/v1>
- Colina, V., & Salgado, J. (2018). *Plan de negocios para la producción de arándanos cultivados en el valle de Cañete y su exportación al mercado de Estados Unidos de América*. Universidad ESAN , Lima. Obtenido de [https://repositorio.esan.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12640/1258/2018\\_RET\\_MBA\\_13-1\\_01\\_T.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.esan.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12640/1258/2018_RET_MBA_13-1_01_T.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Díaz, M., Rodas, J., Gonzalez, L., & Vera, M. (2021). Control de la oxidación fenólica de segmentos nodales de *Handroanthus heptaphyllus* en condiciones in vitro. *CEDAMAZ*, 11(1).
- El Comercio. (27 de Noviembre de 2021). El cultivo del arándano se abre campo en el país. *El Comercio*. Obtenido de <https://www.elcomercio.com/actualidad/ecuador/cultivo-arandano-se-abre-campo.html>
- El Telégrafo. (31 de Mayo de 2018). Ecuador emprende producción de arándanos para consumo interno. *El Telégrafo*. Obtenido de <https://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/economia/1/ecuador-arandanos-consumo-interno>

- Flores, G. (2017). *Efectos de tres dosis de extracto de saponia de quinua (Chenopodium quinoa Willd) en su forma sobrenadante para el control del hongo botrytis sp. bajo condiciones de laboratorio y en cultivo de haba*. Universidad Mayor de San Andrés , La Paz.
- Gil, E., Rojas, F., García, N., & Carvajal, J. (2022). POP-10 Composición química y nutricional de la Uva camarona: un arándano endémico de alta montaña. *Productos Naturales*, 5(2). Obtenido de <https://nozomiscience.org/index.php/rpn/article/view/6869>
- González, A., & Morales, C. (2017). Variedades de Arándanos. *Boletín del Instituto de Investigaciones Agropecuarias*, 1(6).
- Gonzalez, A., Morales, C., Riquelme, J., France, A., Hirzel, J., Uribe, H., . . . Becerra, C. (2017). Manual de manejo agronómico del arándano. *Boletín INIA*, 371, 11-20.
- Google Maps. (2022). *Ubicación de Leplant*. Obtenido de <https://www.google.com/maps/place/LePlant/@-1.2390871,-78.6368836,17z/data=!4m5!3m4!1s0x91d381c760456979:0xd1bbbd6923d3f51a!8m2!3d-1.2390871!4d-78.6346949?hl=es-419>
- Guaman, D. (2018). Desarrollo de un protocolo de establecimiento in vitro de mora de castilla (rubus glaucus benth) a partir de meristemos axilares. Universidad Tecnica de Ambato, Ecuador. Obtenido de <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/27506>
- Gutiérrez, I., López, S., Magadán, P., Fernández, L., Pérez, A., Tuñón, M., . . . Lombo, F. (2021). Terpenoides y polifenoles como agentes antioxidantes naturales en la conservación de alimentos. *MDPI*, 10(8), 1264-1274.
- Gutiérrez, M. (2021). *Control de contaminantes microbianos en el establecimiento in vitro por segmentos nodales de Vaccinium corymbosum (Arándano)*. Universidad Católica de Santa María , Arequipa. Obtenido de

<https://tesis.ucsm.edu.pe/repositorio/bitstream/handle/20.500.12920/11126/42.0251.IB.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Gutiérrez, Y., Folgueras, M., Santos, A., López, J., Medero, V., Reinaldo, D., & Alvarado, Y. (2019). Manejo de la contaminación bacteriana en la propagación in vitro de yemas axilares de *Colocasia esculenta* cv. 'INIVIT MC-2012. *Biotecnología Vegetal*, 19(2). Obtenido de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S2074-86472019000200147&script=sci\\_arttext&tlng=en](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S2074-86472019000200147&script=sci_arttext&tlng=en)

Hajazimi, E., Landberg, R., & Zamaratskaia, G. (2016). Simultaneous determination of flavonols and phenolic acids by HPLC-CoulArray in berries common in the Nordic diet. *ELSEVIER*, 74(1), 128-134. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643816304376>

Hernández, Y., & González, M. (2020). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento in vitro de frutales perennes. *Cultivos Tropicales*, 31(4).

Indacochea, B., Parrales, J., Hernández, A., Castro, C., Vera, M., Zhindón, A., & Gabriel, J. (2018). Evaluación de medios de cultivo in vitro para especies forestales nativas en peligro de extinción en Ecuador. *Agronomía Costarricense*, 42(1). Retrieved from [https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0377-94242018000100063](https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0377-94242018000100063)

Jiménez, V., & Abdelnour, A. (2018). Protocolo de micropropagación de arándano nativo de Costa Rica (*Vaccinium consanguineum*). *Revista Tecnología en Marcha*, 31(1). Obtenido de [https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0379-39822018000100144&script=sci\\_arttext](https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0379-39822018000100144&script=sci_arttext)

Jurikova, T., Skrovankova, S., Micek, J., Balla, S., & Snopek, L. (2019). Bioactive Compounds, Antioxidant Activity, and Biological Effects of European Cranberry (*Vaccinium oxycoccos*). *MDPI*, 24(1), 24-35. Obtenido de <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/1/24>

- Kalt, G., Cassidy, A., Howard, L., Krikorian, R., Stull, A., Tremblay, F., & Zamora, R. (2020). Investigaciones recientes sobre los beneficios para la salud de los arándanos y sus antocianinas. *Advances in Nutrition*, 11(2), 224–236. Retrieved from <https://academic.oup.com/advances/article/11/2/224/5536953?login=false>
- Leiva, M., & Toapanta, A. (2021). *Obtención de un banco de plantas donantes de arándanos (Vaccinium corymbosum L.) para el establecimiento in vitro de segmentos nodales en medio de cultivo semisólido*. Universidad Técnica de Ambato, Ambato. Obtenido de <https://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/33470>
- Lobos, G., & Hancock, J. (2015). Mejoramiento de arándanos para un entorno global cambiante: una revisión. *PubMed*, 6(1), 782-800. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4588112/>
- Lostanau, G. (2015). *Efecto de diferentes concentraciones de ácido giberélico en la multiplicación de arándano (Vaccinium corymbosum cv. Biloxi) en la provincia de Huaraz Ancash*. Universidad Nacional Santiago Antunéz de Mayolo, Huaraz Ancash.
- Luan, X., Shi, H., Xu, B., Zhang, Q., & Liu, L. (2021). Efecto del carbón activado en el enraizamiento de plántulas de cultivo de tejidos de pera Qiuzi. *Molecular Plant Breeding*, 12(10). doi:10.5376/mpb.2021.12.001
- Madzikane, O., Gebashe, F., & Amoo, S. (2022). Use of Alternative Components in Cost-Effective Media for Mass Production of Clonal Plants. *SpringerLink*, 2(1), 49-64.
- Mangena, P. (2020). Benzyl adenine in plant tissue culture- succinct analysis of the overall influence in soybean [Glycine max (L.) Merrill.] seed and shoot culture establishment. *Journal of Biotech Research*, 11(1), 23-34. Obtenido de <http://btsjournals.com/assets/2020v11p23-3440202.pdf>

- Meléndez, M., Flor, L., Sandoval, M., Vsquez, W., & Racines, M. (2021). *Vaccinium* spp.: Karyotypic and phylogenetic characteristics, nutritional composition, edaphoclimatic conditions, biotic factors and beneficial microorganisms in the rhizosphere. *Scientia Agropecuaria*, 12(1). Obtenido de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2077-99172021000100109](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2077-99172021000100109)
- Moncayo, P. (2022). *Propagación in situ del banano maqueño red dacca utilizando bencil amino purina y ácido indolacético*. Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Obtenido de <https://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/6635/1/T-UTEQ-324.pdf>
- Montiel, L., Enríquez, J., & Cisneros, A. (2019). Propagación in vitro de *Hylocereus monacanthus* (Lem.) Britton y Rose. *Bioteología Vegetal*, 16(2), 112-134. Obtenido de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/516/pdf>
- Monzón, P. (2021). *Micropropagación de Amburana acreana (ishpingo) a partir de yemas apicales provenientes de la germinación in vitro de semillas*. Universsidad Nacional Agraria La Molina, Lima.
- Morales, M., Espinosa, C., & Garza, R. (2016). Cultivo de tejidos vegetales y su aplicación en productos naturales. *Dialnet*, 2(2), 351-410. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8595958>
- Morante, J., & Cruz, N. (2022). *PLANTAS MEDICINALES Alimentos claves para la vida*. Guayaquil: Editorial Grupo Compás. Obtenido de <http://142.93.18.15:8080/jspui/bitstream/123456789/803/1/Plantas%20medicinales-%20Jaime%20Morante1.pdf>
- Muller, D., García, P., Travacio, A., & Bueno, M. (2017). Establecimiento in vitro de *Zephyranthes* spp. *Bioteología Vegetal*, 17(1), 19-24. Obtenido de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/533/pdf>
- Nemeth, D., Lambrinos, J., & Strik, B. (2017). Los efectos de la gestión a largo plazo en los patrones de almacenamiento de carbono en un sistema de producción de

arándanos highbush del norte. *Ciencia del Medio Ambiente Total*, 479(1), 1084-1093. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0048969716325153>

Nitta, H., Malik, S., De Costa, F., Yousefzadi, M., Hossein, M., Arroo, R., . . . Fett, A. (2017). Specialized Plant Metabolism Characteristics and Impact on Target Molecule Biotechnological Production. *Springer Link*, 60(1), 169-183. Retrieved from <https://link.springer.com/article/10.1007/s12033-017-0056-1>

Ojeda, J. (2020). *Protocolo para establecimiento in vitro de lima ácida (Citrus aurantiifolia (Christm.) Swingle) a partir de meristemas: Revisión de literatura*. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras. Obtenido de <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/e2545a1e-0bdb-4fbd-852a-80547ce53451/content>

Pastorelli, S. (2020). *Factores de crecimiento en la exportación del arándano producido en la Libertad, Perú*. Universidad de San Martín de Porres, Lima. Obtenido de [https://repositorio.usmp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12727/7371/carrasco\\_mlj-montalvo\\_gla.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.usmp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12727/7371/carrasco_mlj-montalvo_gla.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Pérez, S., Leyva, N., Magallanes, M., Arce, A., & Méndez, A. (2016). Hongos contaminantes en el establecimiento in vitro de ápices de papa. *Cultivos Tropicales*, 37(4). Obtenido de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0258-59362016000400007#:~:text=Fusarium%20y%20Penicillium%20son%20los,el%20C3%A9xito%20de%20este%20sistema.](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362016000400007#:~:text=Fusarium%20y%20Penicillium%20son%20los,el%20C3%A9xito%20de%20este%20sistema.)

Pérez, V. (2018). *Efecto de diferentes concentraciones de Ácido Indolbutírico (AIB) en el enraizamiento de estaquillas de Annona muricata "Guanábana" en el vivero de la UNIA*. Universidad Nacional Intercultural de la Amazonía, Yarinacocha.

- Phillips, G., & Garda, M. (2019). Plant tissue culture media and practices: an overview. *SpringerLink*, 55(1), 242–257. Obtenido de <https://link.springer.com/article/10.1007/s11627-019-09983-5>
- Pinedo, S. (2018). Caracterización fisicoquímica y organoléptica de variedades comerciales de arándano y otras especies del genero *Vaccinium*. *Revista Científica UNTRM: Ciencias Naturales e Ingeniería*, 1(3), 52-58. Obtenido de <http://revistas.untrm.edu.pe/index.php/CNI/article/view/426/552>
- Podwyszynska, M., Orlikoska, T., Trojaj, A., & Wojtania, A. (2022). Application and Improvement of In Vitro Culture Systems for Commercial Production of Ornamental, Fruit, and Industrial Plants in Poland. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 91(1), 1-29. Obtenido de [https://www.researchgate.net/profile/Teresa-Orlikowska-2/publication/362004446\\_Application\\_and\\_Improvement\\_of\\_In\\_Vitro\\_Culture\\_Systems\\_for\\_Commercial\\_Production\\_of\\_Ornamental\\_Fruit\\_and\\_Industrial\\_Plants\\_in\\_Poland/links/62ee6c1d0b37cc3447764405/Application](https://www.researchgate.net/profile/Teresa-Orlikowska-2/publication/362004446_Application_and_Improvement_of_In_Vitro_Culture_Systems_for_Commercial_Production_of_Ornamental_Fruit_and_Industrial_Plants_in_Poland/links/62ee6c1d0b37cc3447764405/Application)
- Quispe, A. (2019). *Auxinas y citoquinina en la micro propagación de arándano (Vaccinium corymbosum L.) de las variedades Biloxi y Misty en Arequipa*. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Arequipa. Obtenido de <http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/10987/IAquamac1.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Ramírez, R., Puente, C., Chávez, J., Espinoza, B., García, M., Guillén, R., & González, G. (2021). Extracto de vermicompost como medio basal en la etapa de multiplicación y enraizamiento in vitro de *Dasyliirion cedrosanum*. *Terra Latinoamericana*, 39(1).
- Retamales, J., & Hancock, J. (2018). *Blueberries*. Boston: Cro production science in horticulture series. Obtenido de [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=eVloDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR1&dq=blueberry+taxonomy&ots=ar3RtmtBg\\_&sig=dluA5sxml9ziIH6fFv9SyjRZMss#v=onepage&q&f=true](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=eVloDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR1&dq=blueberry+taxonomy&ots=ar3RtmtBg_&sig=dluA5sxml9ziIH6fFv9SyjRZMss#v=onepage&q&f=true)

- Reyes, V., & Salcedo, J. (2017). *Efecto del extracto crudo de frutos frescos de Vaccinium corymbosum "arándano" en Rattus norvegicus var. albinus con hiperglicemia inducida*. Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo.
- Rivadeneira, M. (2022). Características botánicas, variedades, poda y manejo del cultivo en arándano. *Horticultura*, 1(1), 203-221. Obtenido de [https://repositorio.inta.gob.ar/bitstream/handle/20.500.12123/12070/INTA\\_CREntreRios\\_EEAConcordia\\_Rivadeneira\\_MF\\_Arandanos\\_Caracter%c3%ads\\_ticas\\_bot%c3%alnicas\\_variedades.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.inta.gob.ar/bitstream/handle/20.500.12123/12070/INTA_CREntreRios_EEAConcordia_Rivadeneira_MF_Arandanos_Caracter%c3%ads_ticas_bot%c3%alnicas_variedades.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Rodríguez, M., & Morales, D. (2015). Efecto de mallas sombreadoras sobre la producción y calidad de frutos de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) cv Brigitta. *Scientia A gropecuaria*, 6(1), 41-50.
- Rodríguez, R. (2021). *Manejo agronómico del cultivo de arándano (Vaccinium spp) en condiciones del valle de Chao, La Libertad*. Universidad Privada Antenor Orrego, Trujillo. Obtenido de [http://200.62.226.186/bitstream/20.500.12759/8236/1/REP\\_RIARDO.RODRIGUEZ\\_MANEJO.AGRONOMICO.DEL.CULTIVO.pdf](http://200.62.226.186/bitstream/20.500.12759/8236/1/REP_RIARDO.RODRIGUEZ_MANEJO.AGRONOMICO.DEL.CULTIVO.pdf)
- Rojas, K. (2019). *Efecto de la citocinina (6-Benzil Amino Purina) y auxina (Ácido Indol 3-Butírico) en la propagación in vitro de tres clones de Alstroemeria spp*. Universidad Nacional de Cajamarca, Cajamarca.
- Romanov, G., Lomin, S., & Schmulling, T. (2018). Señalización de citoquininas: ¿desde el ER o desde el PM? ¡Esa es la pregunta! *New Phytologist*, 28(1), 41-53.
- Ruffo, S., & Colombo, R. (2020). Innovation in Propagation of Fruit, Vegetable and Ornamental Plants. *MDPI*, 6(2). doi:<https://doi.org/10.3390/horticulturae6020023>
- Salamanca, K., & Hurtado, J. (2019). *Montaje de una empresa productora y comercializadora de arándanos ubicada en la Provincia Sabana Occidental de Cundinamarca*. Universidad Distrital Francisco José Caldas, Bogotá.

Obtenido de  
<https://repository.udistrital.edu.co/bitstream/handle/11349/16253/SalamancaKaterine2019.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

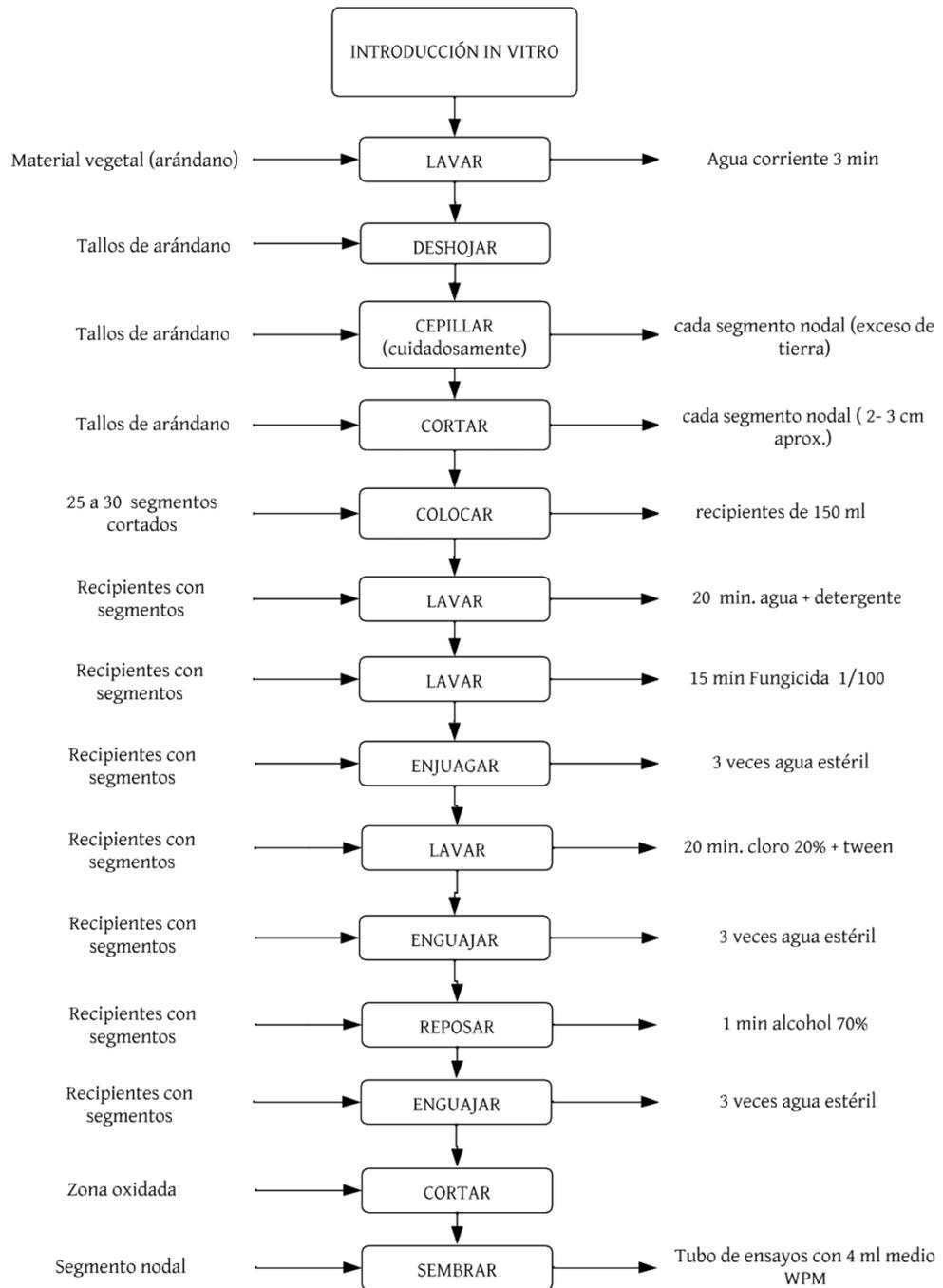
- Sánchez, S., Sánchez, S., Condoy, A., Sisalema, P., Barrezueta, S., & Jaramillo, E. (2020). Uso de biocarbones en medios de cultivo para el crecimiento de *Trichoderma* spp. in vitro. *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 3(2). Retrieved from <http://remca.umet.edu.ec/index.php/REMCA/article/view/267>
- Sarropoulou, V., Dimassi, K., & Therios, L. (2014). In vitro plant regeneration from leaf explants of the cherry rootstocks CAB-6P, Gisela 6, and MxM 14 using sodium nitroprusside. *SpringerLink*, 50(1), 226–234.
- Schuchovski, C., SantÁnna, B., Marra, C., & Biasi, L. (2020). Información morfológica y anatómica sobre la organogénesis de brotes de novo de arándanos ojo de conejo 'Delite' in vitro. *ELSEVIER*, 6(11).
- Sivaramakrishnan, R., & Incharoensakdi, A. (2020). Enriquecimiento inducido por hormonas vegetales de *Chlorella* sp. ácidos grasos omega-3. *SpringerLink*, 13(1).
- Sudheer, W., Praveen, N., Khayri, J., & Jain, S. (2022). Chapter 3 - Role of plant tissue culture medium components. *ELSEVIER*, 51-83. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323907958000126>
- Tobar , G., Casas, N., Orellana, P., & Petzold, G. (2021). Jugo de arándanos: compuestos bioactivos, impacto en la salud y tecnologías de concentración: una revisión. *Revista de ciencia de los alimentos*, 86(12), 5062-5077. Obtenido de <https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1750-3841.15944>
- Vélez, Y. (2021). *Rescate y conservación de la especie *Brownea multijuga* Britton & Killip (clavellín), mediante la técnica de propagación asexual, utilizando las hormonas enraizantes Ácido Naftalenacético (ANA) y Ácido Indolbutírico (AIB)*. Universidad de Quevedo, Quevedo.

- Wijerathna, A., Ramtekey, V., Ranawaka, B., & Bhoja, C. (2022). Aplicaciones de las Tecnologías de Cultivo de Tejidos In Vitro en el Mejoramiento Genético y Genético del Trigo. *MDPI*, *11*(17), 2273-2289. Obtenido de <https://www.mdpi.com/2223-7747/11/17/2273>
- Yam, T., & Arditti, J. (2018). Orchid Micropropagation: An Overview of Approaches and Methodologies. *Springer Link*, *2*(1), 151-178.
- Yang, C., Núñez, G., Da Silva, M., Phillips, D., & Muñoz, P. (2020). Una revisión de los sistemas alternativos de producción de arándanos de Southern Highbush. *MDPI*, *10*(10), 1531-1542. Obtenido de <https://www.mdpi.com/2073-4395/10/10/1531>
- Yang, Y., Liu, M., Niu, N., Wang, H., Wang, B., Li, M., . . . Wu, Y. (2019). Identificación de especies de bayas pequeñas en alimentos y jugos mediante PCR en tiempo real basada en TaqMan. *PubMed*, *102*(5), 1552-1566. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30846025/>

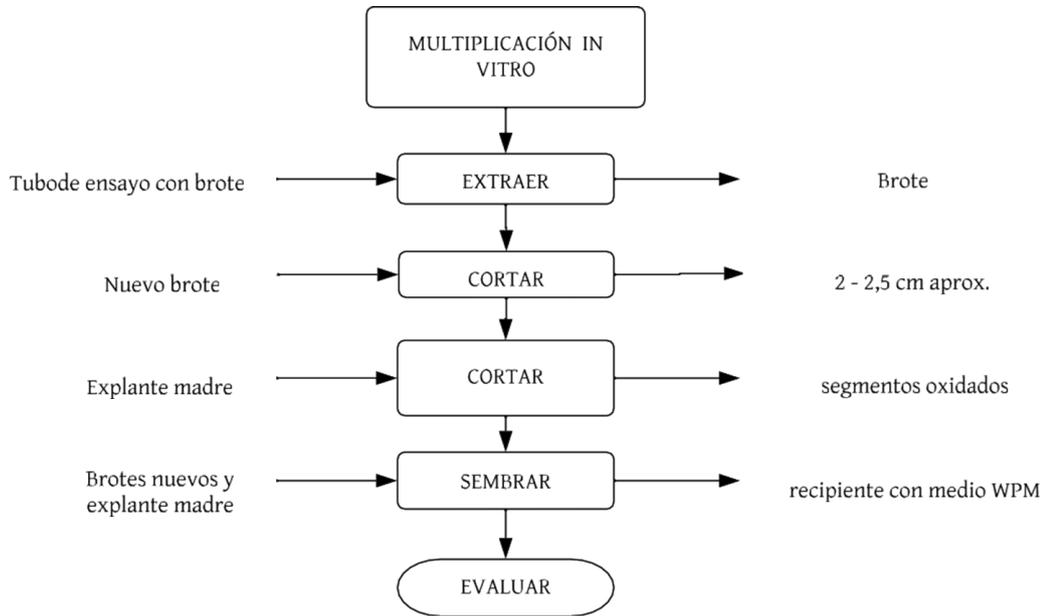
## ANEXOS

### Anexo A Diagramas de Proceso

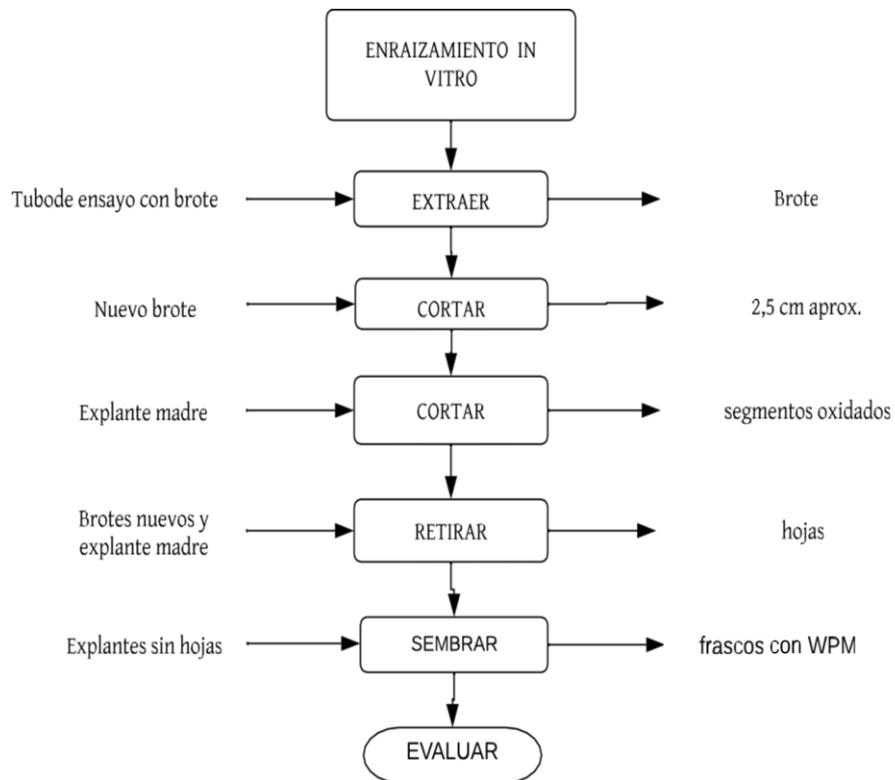
#### Anexo 1-A Procedimiento para introducción *in vitro* de arándano.



**Anexo 2-A** Procedimiento para multiplicación *in vitro* de arándano.



**Anexo 3-A** Procedimiento para enraizamiento *in vitro* de arándano.



**Anexo B** Tratamientos de medios de cultivo

**Anexo 1-B** Tratamientos en la etapa de multiplicación.

**Tabla 8.** Tratamientos de medios de cultivo para multiplicación de arándano

<b>Reactivo</b>	<b>Tratamiento 1</b>	<b>Tratamiento 2</b>	<b>Tratamiento 3</b>
Macronutrientes	10 ml	10 ml	10 ml
Micronutrientes	10 ml	10 ml	10 ml
Quelatos	20 ml	20 ml	20 ml
2iP	1,5 mg/L	2,0 mg/L	2,5 mg/L
Myo inositol	0,1 g	0,1 g	0,1 g
Acido nicotínico	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
piridoxina	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
Tiamina	1 ml	1 ml	1 ml
Glicina	1 ml	1 ml	1 ml
Sacarosa	30 g	30 g	30 g
Agar	7 g	7 g	7 g
pH	5,4	5,4	5,4

**Anexo 2-B**      Tratamientos en la etapa de enraizamiento

**Tabla 9.** Tratamientos de medios de cultivo para enraizamiento de arándano

<b>Reactivo</b>	<b>Tratamiento 1</b>	<b>Tratamiento 2</b>	<b>Tratamiento 3</b>
Macronutrientes	10 ml	10 ml	10 ml
Micronutrientes	10 ml	10 ml	10 ml
Quelatos	20 ml	20 ml	20 ml
AIB	1,5 mg/L	2.0 mg/L	2,5 mg/L
Myo inositol	0,1 g	0,1 g	0,1 g
Acido nicotínico	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
piridoxina	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
Tiamina	1 ml	1 ml	1 ml
Glicina	1 ml	1 ml	1 ml
Sacarosa	30 g	30 g	30 g
Agar	7 g	7 g	7 g
Carbon Activado	0,3 g	0.6 g	0.8 g
pH	5,4	5,4	5,4

**Anexo C**      Diseño Experimental

**Anexo 1-C** Diseño Cuadrado Latino etapa de multiplicación.

**Tabla 10.** Niveles de variables influyentes en la etapa de **multiplicación** de *V. corymbosum*

	[2iP] (mg/L)	DENSIDAD (N° plantas/Frasco)		VOLUMEN (ml/Frasco)	
A	1,5	<b>I</b>	20	<b>1</b>	20
B	2	<b>II</b>	25	<b>2</b>	30
C	2,5	<b>III</b>	30	<b>3</b>	40

**Tabla 11.** Diseño Experimental Cuadrados Latinos (etapa de multiplicación)

		<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>
		DENSIDAD EXPLANTES		
	[2iP] [ml WPM]	20	25	30
<b>1</b>	20	<b>A - 1,5</b>	<b>B - 2,0</b>	<b>C - 2,5</b>
<b>2</b>	30	<b>C - 2,5</b>	<b>A - 1,5</b>	<b>B - 2,0</b>
<b>3</b>	40	<b>B - 2,0</b>	<b>C - 2,5</b>	<b>A - 1,5</b>

**Anexo 2-C** Diseño Cuadrado Latinos etapa de enraizamiento.

**Tabla 12.** Niveles de variables influyentes en la etapa de **enraizamiento** de *V. corymbosum*

[AIB] (mg/L)	DENSIDAD (N° plantas/Frasco)	[CA] (g/L)
A 1,5	<b>I</b> 10	<b>1</b> 0,3
B 2	<b>II</b> 15	<b>2</b> 0,6
C 2,5	<b>III</b> 20	<b>3</b> 0,8

**Tabla 13.** Diseño Experimental Cuadrados Latinos (etapa de enraizamiento)

		<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>
	<b>[2iP]</b>	DENSIDAD EXPLANTES		
	[CA]	10	15	20
<b>1</b>	300	<b>A - 1,5</b>	<b>B - 2,0</b>	<b>C - 2,5</b>
<b>2</b>	600	<b>C - 2,5</b>	<b>A - 1,5</b>	<b>B - 2,0</b>
<b>3</b>	800	<b>B - 2,0</b>	<b>C - 2,5</b>	<b>A - 1,5</b>

**Anexo 3-C** Prueba de ANOVA y Tuckey para la contaminación por hongos en la etapa de desinfección

**Tabla 14.** Análisis de Varianza entre la contaminación por hongos vs los tratamientos etapa de desinfección

**ANOVA**

Hongos

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,053	2	,027	1,025	,360
Dentro de grupos	11,627	447	,026		

Total	11,680	449			
-------	--------	-----	--	--	--

**Anexo 4-C** Prueba de Tuckey entre la contaminación por hongos vs los tratamientos etapa de desinfección

**Hongos**

HSD Tukey<sup>a</sup>

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	
2	150		,01
1	150		,03
3	150		,04
Sig.			,325

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 150,000.

**Anexo 5-C** Prueba de ANOVA y Tuckey para la contaminación por bacterias en la etapa de desinfección

**Tabla 15.** Análisis de Varianza entre la contaminación por bacterias vs los tratamientos etapa de desinfección

**ANOVA**

Bacterias

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,698	2	,349	6,553	,002
Dentro de grupos	23,800	447	,053		
Total	24,498	449			

**Tabla 16.** Prueba de Tuckey entre la contaminación por bacterias vs los tratamientos etapa de desinfección

**Bacterias**

HSD Tukey<sup>a</sup>

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
T2	150	,03	
T0	150	,03	
T1	150		,11
Sig.		,966	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 150,000.

**Anexo 6-C** Prueba de ANOVA y Tuckey para el oxidado potencial en la etapa de desinfección

**Tabla 17.** Análisis de Varianza entre el oxidado potencial vs los tratamientos etapa de desinfección

**ANOVA**

Oxidado\_vivo

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,693	2	,347	3,893	,021
Dentro de grupos	39,807	447	,089		
Total	40,500	449			

**Tabla 18.** Prueba de Tuckey entre el oxidado potencial vs los tratamientos etapa de desinfección

**Oxidado\_vivo**

HSD Tukey<sup>a</sup>

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
T2	150	,06	
T0	150	,09	,09
T1	150		,15
Sig.		,719	,130

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 150,000.

**Anexo 7-C** Prueba de ANOVA y Tuckey para el oxidado muerto en la etapa de desinfección

**Tabla 19.** Análisis de Varianza entre el oxidado muerto vs los tratamientos etapa de desinfección

**ANOVA**

Oxidado\_muerto

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,004	2	,002	,023	,978
Dentro de grupos	43,660	447	,098		
Total	43,664	449			

**Anexo 8-C** Prueba de Tuckey entre el oxidado muerto vs los tratamientos etapa de desinfección

**Oxidado\_muerto**

HSD Tukey<sup>a</sup>

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	
T2	150		,11
T0	150		,11
T1	150		,11
Sig.			,981

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 150,000.

**Anexo 9-C** Prueba de ANOVA y Tuckey para la viabilidad de explantes en la etapa de desinfección

**Tabla 20.** Análisis de Varianza entre la viabilidad vs los tratamientos etapa de desinfección

**ANOVA**

Viabilidad	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,071	2	,036	2,697	,069
Dentro de grupos	5,893	447	,013		
Total	5,964	449			

**Tabla 21.** Prueba de Tuckey entre la viabilidad vs los tratamientos etapa de desinfección

<b>Viabilidad</b>			
HSD Tukey <sup>a</sup>			
Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	
T1	150	1,0000	
T2	150	1,0000	
T0	150	1,0267	
Sig.		,111	

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 150,000.

**Anexo 10-C** Prueba de ANOVA para la contaminación por bacterias en la etapa de introducción

**Tabla 22.** Análisis de Varianza entre la contaminación por bacterias vs los tratamientos etapa de introducción

<b>ANOVA</b>					
Bacterias					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,625	1	,625	6,333	,016
Dentro de grupos	3,750	38	,099		
Total	4,375	39			

**Anexo 11-C** Prueba de ANOVA para la viabilidad de explantes en la etapa de introducción

**Tabla 23.** Análisis de Varianza entre la viabilidad de explantes vs los tratamientos etapa de introducción

<b>ANOVA</b>					
Viabilidad					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3,600	1	3,600	28,500	,000
Dentro de grupos	4,800	38	,126		
Total	8,400	39			

**Anexo 12-C** Prueba de ANOVA para la oxidación potencial en la etapa de introducción

**Tabla 24.** Análisis de Varianza entre la oxidación potencial vs los tratamientos etapa de introducción

<b>ANOVA</b>					
Oxidado_vivo					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	2,025	1	2,025	15,545	,000
Dentro de grupos	4,950	38	,130		
Total	6,975	39			

**Anexo 13-C** Prueba de ANOVA para la oxidación muerta en la etapa de introducción

**Tabla 25.** Análisis de Varianza entre la oxidación muerta vs los tratamientos etapa de introducción

**ANOVA**

Oxidado\_muerto

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1,225	1	1,225	5,444	,025
Dentro de grupos	8,550	38	,225		
Total	9,775	39			

**Anexo 14-C** Prueba de ANOVA y Tuckey para el índice de crecimiento en la etapa de multiplicación

**Tabla 26.** Análisis de Varianza entre el índice de crecimiento vs los tratamientos etapa de multiplicación

**ANOVA de un factor**

Indice\_crecimiento

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	3325,525	8	415,691	,793	,616
Intra-grupos	9438,568	18	524,365		
Total	12764,092	26			

**Tabla 27.** Prueba de Tuckey entre el índice de crecimiento vs los tratamientos  
etapa de multiplicación

**Indice\_crecimiento**

HSD de Tukey<sup>a</sup>

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	
2,00	3		80,7733
4,00	3		82,2000
7,00	3		88,9800
1,00	3		95,7600
3,00	3		97,5167
6,00	3		99,1467
9,00	3		106,0600
5,00	3		111,0300
8,00	3		113,6433
Sig.			,706

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

**Anexo 15-C** Prueba de ANOVA y Tuckey para el índice de enraizamiento

**Tabla 28.** Análisis de Varianza entre el índice de enraizamiento vs los  
tratamientos etapa de multiplicación

**ANOVA de un factor**

Indice\_enraizamiento

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1322,994	8	165,374	99224,540	,000
Intra-grupos	,030	18	,002		
Total	1323,024	26			

**Tabla 29.** Prueba de Tuckey entre el índice de enraizamiento vs los tratamientos  
etapa de multiplicación

**Indice\_enraizamiento**

HSD de Tukey<sup>a</sup>

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1,00	3	60,0000								
7,00	3		64,0000							
4,00	3			65,0000						
2,00	3				66,6700					
9,00	3					68,0000				
8,00	3						72,0000			
3,00	3							73,3200		
5,00	3								75,0000	
6,00	3									85,0000
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

**Anexo D** Imágenes del procedimiento y resultado de cada etapa



**Anexo 1-D** Recepción del material vegetal



**Anexo 4-D** Anexo 4-D. agentes desinfectantes



**Anexo 2-D** Despojo de hojas para introducción por segmentos nodales



**Anexo 5-D** Tratamientos de desinfección solución jabonosa



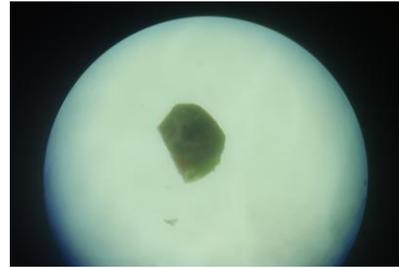
**Anexo 3-D** Corte de material vegetal



**Anexo 6-D** Tratamiento con hipoclorito de sodio



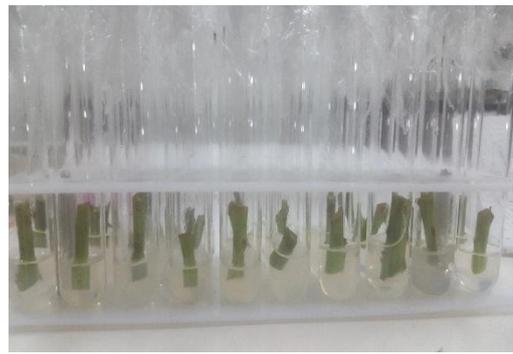
**Anexo 7-D** Tratamiento con fungicida



**Anexo 10-D** Vista de meristemo a través de estereoscopio



**Anexo 8-D** Preparación de material para su inoculación



**Anexo 11-D** Explantes introducidos por segmentos nodales



**Anexo 9-D** Prueba de siembra a través de meristemas



**Anexo 12-D** A. Meristemo oxidado y contaminado B. Explante vivo



**Anexo 13-D** Explantes multiplicados



**Anexo 15-D** Vista explantes A. multiplicacion B. enaizamiento



**Anexo 14-D** Explantes enraizados



**Anexo 16-D** Explantes enraizados