



Universidad
Nacional
de Loja

Universidad Nacional de Loja

Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables

Carrera de Agronomía

Protocolo para la propagación *in vitro* de arándano

(*Vaccinium corymbosum* L.) cv. Biloxi.

Trabajo de Integración
Curricular, previo a la obtención
del título de ingeniera Agrónoma.

AUTORA:

Leidy Stefania Cueva Ramos

DIRECTOR:

Ing. Johnny Fernando Granja Trávez Mg. Sc.

Loja - Ecuador

2024

Certificación

Loja, 16 de agosto de 2023

Ing. Johnny Fernando Granja Trávez Mg. Sc.

DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

CERTIFICO:

Que he revisado y orientado todo el proceso de elaboración del Trabajo de Integración Curricular denominado: **Protocolo para la propagación *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) cv. Biloxi**, previo a la obtención del título de **Ingeniera Agrónoma**, de la autoría de la estudiante **Leidy Stefania Cueva Ramos**, con **cédula de identidad Nro.1105487621**, una vez que el trabajo cumple con todos los requisitos exigidos por la Universidad Nacional de Loja, para el efecto, autorizo la presentación del mismo para su respectiva sustentación y defensa.



Ing. Johnny Fernando Granja Trávez Mg. Sc.

DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Autoría

Yo, **Leidy Stefania Cueva Ramos**, declaro ser autora del presente Trabajo de Integración Curricular y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos y acciones legales, por el contenido del mismo. Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja la publicación de mi Trabajo de Integración Curricular, en el Repositorio Digital Institucional – Biblioteca Virtual.

Firma:



Cédula de identidad: 1105487621

Fecha: 12 de enero de 2024

Correo electrónico: leidy.cueva@unl.edu.ec

Teléfono: 0959544073

Carta de autorización por parte de la autora, para consulta, reproducción parcial o total y/o publicación electrónica del texto completo, del Trabajo de Integración Curricular.

Yo, **Leidy Stefania Cueva Ramos**, declaro ser autora del Trabajo de Integración Curricular denominado: **Protocolo para la propagación *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) cv. Biloxi**, como requisito para optar por el título de **Ingeniera Agrónoma**, autorizo al sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que, con fines académicos, muestre la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido en el Repositorio Institucional.

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el Repositorio Institucional, en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia del Trabajo de Integración Curricular que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, suscribo, en la ciudad de Loja, a los doce días del mes de enero de dos mil veinticuatro.

Firma:



Autora: Leidy Stefania Cueva Ramos

Cédula de identidad: 1105487621

Dirección: Loja – Puyango.

Correo electrónico: leidy.cueva@unl.edu.ec

Teléfono: 0959544073

DATOS COMPLEMENTARIOS:

Director del Trabajo de Integración Curricular:

Ing. Johnny Fernando Granja Trávez Mg. Sc.

Dedicatoria

Este Trabajo de Integración Curricular va dedicado a Dios por ser la fuente de mi fortaleza y guía en cada paso de mi vida. A Él le dedico este logro agradeciendo su infinita sabiduría y su constante protección. De manera especial a mis padres, Marlene Ramos y Edgar Cueva, por su amor incondicional, apoyo constante y por ser mi fuente de inspiración, han sido fundamentales en mi formación como persona y profesional. Sin ellos este triunfo no sería posible.

A mis hermanos: Anderson, Karen, Nayely y Samantha, quienes han sido mis compañeros de vida y siempre han sido mi pilar fundamental, agradezco su cariño y complicidad y por creer en mi en todo momento. Su amor y ánimo me han impulsado a seguir adelante.

A mis adorables sobrinos: Evant y Eydan, quienes llenan mi vida de risas y alegrías, les dedico este logro. Su presencia ha sido mi mejor inspiración para dar lo mejor de mí en cada momento.

A toda mi familia, aquellos que han estado presentes en cada etapa de mi vida, brindando su apoyo incondicional. A mi querida tía Elva Ramos, quien siempre fue un faro de amor y apoyo en mi vida. Aunque ya no se encuentra físicamente conmigo esta dedicatoria es un humilde homenaje a su memoria y al profundo amor y gratitud que siento por todo lo que hizo por mí.

A mi pareja, por su inmenso amor, paciencia y comprensión. Gracias por ser mi refugio en mis momentos difíciles y mi cómplice en las alegrías.

Este logro no solo es mío, sino también de cada persona que ha dejado huella en mi camino; profesores, compañeros y amigos. A todas las personas que estuvieron pendientes de mí durante mi proceso de formación. Mi más profundo agradecimiento por su amor, apoyo y por ser parte fundamental en este importante capítulo de mi vida.

Leidy Stefania Cueva Ramos

Agradecimiento

Primero quiero agradecer a Dios, por ser mi fuente de fortaleza y guía en todo momento. A mis padres, hermanos y toda mi familia quienes son parte fundamental en mi vida, gracias por su amor incondicional y apoyo inquebrantable durante mi vida universitaria. A mi enamorado, cuyo apoyo y paciencia han sido fundamentales en este proceso.

Además, quiero agradecer a la Universidad Nacional de Loja por brindarme la oportunidad de aprender y crecer académicamente. A mis profesores por su dedicación y conocimientos compartidos, especialmente a mi director del Trabajo de Integración Curricular, Ing. Johnny Granja Mg. Sc., quien me ha guiado y motivado en cada etapa de esta investigación. Agradecer de igual manera al Ing. For. Víctor Hugo Eras Guamán Mg. Sc. y la ing. Magaly Yaguana técnicos del laboratorio de micropropagación vegetal, quienes han sido fundamentales en el desarrollo de este trabajo; su experiencia y apoyo han sido invaluable.

A todos ustedes, gracias por creer en mí, por su constante apoyo y por ser parte esencial de este logro. ¡Sin su ayuda no hubiese sido posible!

Leidy Stefania Cueva Ramos

Índice de contenidos

Portada.....	i
Certificación.....	ii
Autoría	iii
Carta de autorización	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimiento.....	vi
Índice de contenidos	vii
Índice de tablas:	x
Índice de figuras:	xi
Índice de Anexos:	xii
1. Título.....	1
2. Resumen.....	2
Abstract.....	3
3. Introducción	4
3.1. Objetivo General	5
3.2. Objetivos Específicos.....	5
4. Marco teórico	6
4.1. El cultivo de arándano.....	6
4.1.1. Descripción taxonómica y botánica de la especie.	6
4.1.2. Producción mundial	6
4.1.3. Cultivo de arándano en la provincia de Loja	6
4.2. Métodos de propagación	7
4.2.1. Cultivo de tejidos vegetales	7
4.2.1.1. Etapas del cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales.....	7
a) Selección de la especie.....	7
b) Desinfección del material vegetal.	7

1) Hipoclorito de sodio.....	8
c) Introducción del material <i>in vitro</i>	8
d) Desarrollo del tejido.....	8
e) Enraizamiento y acondicionamiento.....	8
f) Adaptación de las plántulas.....	8
4.2.1.2. Medios de cultivo.....	9
a) Macronutrientes.....	9
b) Micronutrientes.....	9
c) Reguladores de crecimiento.....	9
1) Auxinas.....	9
El Ácido indol acético.....	10
Ácido indol butírico.....	10
2) Citoquininas.....	10
Zeatina.....	10
2ip.....	10
Kinetina.....	10
d) Sacarosa.....	10
e) Materiales solidificantes.....	10
f) Explante.....	10
1) Oxidación fenólica del explante.....	11
4.2.1.3. Principales medios de cultivo.....	11
a) Murashige y Skoog (MS).....	11
b) Woody Plant Medium (WPM).....	11
4.2.1.4. Importancia del cultivo de tejidos vegetales.....	11
4.2.2. Antecedentes sobre micropropagación de arándano.....	12
4.2.2.1. Propagación <i>in vitro</i> de arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.) a partir de yemas axilares.....	12

4.2.2.2. Protocolo de micropropagación de arándano nativo de Costa Rica (<i>Vaccinium consanguineum</i>).....	12
4.2.2.3. Establecimiento <i>in vitro</i> de arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.).....	12
5. Metodología.....	13
5.1. Localización del estudio.....	13
5.2. Metodología general	13
5.3. Diseño experimental	14
5.4. Metodología para establecer un protocolo de desinfección explantes de arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.) cv. Biloxi, aplicando diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempos de inmersión”.....	18
5.5. Metodología para evaluar dos fórmulas de medio de cultivo y la interacción hormonal para la propagación <i>in vitro</i> de arándano”	20
5.6. Análisis de estadístico.....	21
6. Resultados.....	22
6.2.1. Porcentaje de contaminación	22
6.2.2. Porcentaje de oxidación fenólica de los explantes.....	23
6.2.3. Tasa total de pérdida	24
6.3.1. Porcentaje de brotación.....	25
6.3.2. Longitud del brote.....	26
6.3.3. Número de hojas	27
7. Discusión.....	28
8. Conclusiones.....	32
9. Recomendaciones.....	33
10. Bibliografía.....	34
11. Anexos.....	41

Índice de tablas:

Tabla 1. Tratamientos de desinfección; concentraciones y tiempos de inmersión para un protocolo de propagación <i>in vitro</i> de arándano.....	14
Tabla 2. Especificaciones del diseño experimental para la desinfección de explantes de arándano, provenientes de campo.	15
Tabla 3. Tratamientos de establecimiento: dos fórmulas de medio de cultivo y la interacción hormonal para la propagación <i>in vitro</i> de arándano.....	16
Tabla 4. Especificaciones del diseño experimental para la inducción de organogénesis directa en explantes de arándano.	17

Índice de figuras:

Figura 1. Mapa de la ubicación del Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Universidad Nacional de Loja.....	13
Figura 2. Tratamientos ensayados para evaluar la desinfección de explantes de arándano..	15
Figura 3. Tratamientos aplicados para la inducción de organogénesis directa, a partir de explantes de arándano.	17
Figura 4. Porcentaje de explantes sanos de arándano en función de la concentración de NaClO y el tiempo de inmersión.	22
Figura 5. A) Contaminación de explantes de arándano por hongo. B) Contaminación de explantes de arándano por bacteria.	23
Figura 6. Porcentaje de oxidación fenólica de explantes de arándano en función de la concentración de NaClO y el tiempo de inmersión.....	23
Figura 7. Porcentaje de pérdida de explantes de arándano por cada tratamiento a los 30 días de evaluación. Medias con letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).....	24
Figura 8. Porcentaje de explantes de arándano brotados en función de dos fórmulas de medio de cultivo y la interacción hormonal.	25
Figura 9. Longitud del brote en función de dos fórmulas de medio de cultivo y la interacción hormonal.....	26
Figura 10. A) Longitud del brote con medio de cultivo Murashige & Skoog (MS). B) Longitud del brote con medio de cultivo Woody Plant Medium (WPM), a los 60 días de evaluación.....	26
Figura 11. Número de hojas por brote en explantes de arándano por cada tratamiento a los 30 días de evaluación. Medias con letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).	27

Índice de Anexos:

Anexo 1. Preparación del material vegetal: A) deshoje de las varetas y B) desinfección con fungicida (Azoxystrobin + flutriafol).....	41
Anexo 2. Preparación de tratamientos con hipoclorito de sodio (10%,15% y 20%) para exposición de los explantes según los tiempos de inmersión (10 y 15 min).....	41
Anexo 3. Implantación de los explantes de arándano en los tubos de ensayo con medio de cultivo base (Murashige y Skoog) dentro la cámara de flujo laminar	42
Anexo 4. Brotes de explantes de arándano a los 30 días del establecimiento en cuarto de incubación	42
Anexo 5. Datos obtenidos para el protocolo de desinfección, bajo la aplicación de distintas concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempos de inmersión para la propagación <i>in vitro</i> de arándano a los 30 días de evaluación.....	43
Anexo 6. Preparación de medio de cultivo: A) Adición de sacarosa, B) control de pH.....	44
Anexo 7. Tratamientos: A) T2 (MS - 2ip), B) T4 (WPM - 2ip), C) T5 (testigo MS), D) (Testigo WPM) a los 60 días de la implantación.....	44
Anexo 8. Composición del medio base Murashige y Skoog (año 1962).....	45
Anexo 9. Composición del medio Woody Plant Medium (WPM).....	46
Anexo 10. Datos obtenidos para evaluar dos fórmulas de medio de cultivo y la interacción hormonal para la propagación <i>in vitro</i> de arándano a los 30 y 60 días	47
Anexo 11. Análisis de laboratorio de las muestras de cultivo <i>in vitro</i> de arándano.....	48
Anexo 12. Resultados del análisis estadístico ANOVA de la variable porcentaje de contaminación.	49
Anexo 13. Resultados del análisis estadístico ANOVA de la variable porcentaje de fenolización.	49
Anexo 14. Resultados de la prueba de hipótesis marginales de la variable tasa total de pérdida.	50
Anexo 15. Resultados del análisis estadístico ANOVA de la variable número de brotes.....	50
Anexo 16. Resultados del análisis estadístico ANOVA de la variable longitud de brote.....	51
Anexo 17. Resultados del análisis estadístico ANOVA de la variable número de hojas.....	51
Anexo 18. Certificado de traducción del resumen.....	52

1. Título

**Protocolo para la propagación *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.)
cv. Biloxi.**

2. Resumen

El arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) es una fruta de gran importancia debido a su alto contenido de antioxidantes, lo que la convierte en la cuarta frutilla de mayor interés económico a nivel mundial. El crecimiento en la demanda de arándanos en los últimos años ha creado oportunidades para diversificar la producción en el país. Sin embargo, se han identificado dificultades para su reproducción sexual y el enraizamiento de las estacas, lo que hace que el cultivo *in vitro* sea una herramienta eficaz para contrarrestar las limitaciones reproductivas que presenta esta especie. En este contexto la siguiente investigación tuvo como objetivo desarrollar un protocolo para la propagación *in vitro* de arándano a partir de explantes de campo. Durante la etapa de establecimiento *in vitro*, los explantes fueron sometidos a una predesinfección; se sumergieron en fungicida (Azoxystrobin + frutiafol 3 ml L⁻¹) por 3 horas. Se probaron seis tratamientos de desinfección utilizando como agente desinfectante hipoclorito de sodio en distintas concentraciones (10%, 15% y 20%) durante dos tiempos de inmersión (10 y 20 minutos). Después de establecer el protocolo de desinfección, se evaluó y comparó el efecto de dos medios de cultivo: WPM y MS junto con dos citoquininas: kinetina y 2ip en una concentración de 2 mg L⁻¹ sobre el desarrollo de brotes. En ambos casos se utilizó un diseño completamente al azar. Los resultados obtenidos demostraron que el tratamiento de desinfección con hipoclorito de sodio al 15 % durante 10 minutos resultó ser el más efectivo en la desinfección de explantes de arándano, con tan solo el 20 % de pérdida entre explantes contaminados y fenolizados. El tratamiento control con medio basal WPM sin regulador de crecimiento tuvo los valores más altos en la variable longitud de brote y número de hojas a los 60 días.

Palabras clave: *Propagación in vitro, explante, brotación, citoquininas, kinetina, 2ip (γ-dimetilalil aminopurina).*

Abstract

The blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) is a fruit of great importance due to its high antioxidant content, which makes it the fourth most economically important fruit worldwide. The growth in demand for blueberries in recent years has created opportunities to diversify production in the country. However, difficulties have been identified for its sexual reproduction and rooting of cuttings, which makes *in vitro* growing an effective tool to counteract the reproductive limitations of this species. In this context, the following research aimed to develop a protocol for *in vitro* propagation of blueberry from field explants. During the *in vitro* establishment stage, explants were subjected to a pre-disinfection; they were immersed in fungicide (Azoxystrobin + frutiafol 3 ml.L⁻¹) for 3 hours. Six disinfection treatments were tested using sodium hypochlorite as disinfectant agent at different concentrations (10%, 15% and 20%) during two immersion times (10 and 20 minutes). After establishing the disinfection protocol, the effect of two culture media: WPM and MS together with two cytokinins: kinetin and 2ip at a concentration of 2 mg L⁻¹ on shoot development was evaluated and compared. In both cases, a completely randomized design was used. The results obtained showed that the disinfection treatment with 15 % sodium hypochlorite for 10 minutes proved to be the most effective in the disinfection of blueberry explants, with only 20 % loss between contaminated and phenolized explants. The control treatment with WPM basal medium without growth regulator had the highest values for shoot length and number of leaves at 60 days.

Key words: *in vitro* propagation, explant, sprouting, cytokinins, kinetin, 2ip (γ -dimethylallyl aminopurine).

3. Introducción

El arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) es una fruta de gran importancia por su alto contenido de antioxidantes, lo que la convierte en la cuarta frutilla de interés económico en el mundo (Salgado *et al.*, 2018). En el año 2021 la producción mundial de este fruto alcanzó las 235.400 hectáreas, con una producción total de 1,79 millones de toneladas métricas, siendo China, Estados Unidos, Perú y Canadá los principales países productores (USDA, 2023).

En Ecuador de acuerdo a los datos del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) el cultivo de arándanos se inició en el año 2015 y actualmente se cultiva en unas 50 hectáreas de terreno en las provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Azuay y Loja. En el año 2021, la producción de arándanos en el país alcanzó las 750 toneladas. En 2022, la empresa Hortifrut realizó la primera exportación de arándanos, enviando 5 toneladas de este fruto a Países Bajos desde el cantón Zapotillo en Loja.

El cultivo de arándano enfrenta importantes desafíos relacionados con la calidad del material de siembra. En muchos casos este no cumple con las normas fitosanitarias y su procedencia genética es desconocida, lo que tiene un impacto negativo en la calidad de la planta y de sus frutos, siendo así que en el país el rendimiento de este cultivo ha llegado a 1 t/ha. Esto se traduce en una baja producción y pérdidas económicas para los agricultores (Ñacato, 2018). Además, el arándano presenta limitaciones para la propagación vegetativa, las técnicas tradicionales como acodos, estacas o semillas pueden propagar plagas y enfermedades, no garantizan un buen enraizamiento y produce progenies muy heterogéneas (Agrobit, 2022).

Como señala Suarez (2020), la micropropagación se presenta como una alternativa altamente eficiente para la producción masiva de plántulas con características deseables similares a las de la planta madre, además libre de enfermedades lo que garantiza uniformidad en la calidad de los frutos. Esta técnica se basa en el cultivo de explantes (microestacas) en un medio de cultivo que contiene vitaminas, macroelementos, microelementos y reguladores de crecimiento, bajo condiciones asépticas (Agrobit, 2022). Los estudios en micropropagación demuestran que las plántulas de arándano producidas por esta técnica resultan homogéneas, expresando el potencial genético de la especie y logrando rendimientos de 15 a 20 t/ha en comparación con 8 t/ha obtenidas mediante la reproducción sexual (MIDAGRI, 2019). El desarrollo de un protocolo de propagación *in vitro* para una especie determinada, implica el ajuste de las condiciones nutricionales, hormonales y ambientales óptimas para ese genotipo (Hussain *et al.*, 2012).

En el país la falta de protocolos de propagación *in vitro* ha impedido la producción masiva de material vegetal de alta calidad para satisfacer la creciente demanda que genera la apertura al mercado de este nuevo cultivo, especialmente de plantas *in vitro*, por su demostrada calidad y homogeneidad. Por lo tanto, surge la necesidad de desarrollar un protocolo más accesible y económico para los productores nacionales, que les permita reducir costos de producción de las plántulas sin comprometer su calidad. Con este fin, este proyecto se centra en la investigación y desarrollo de un protocolo para la propagación *in vitro* de explantes de arándano obtenidos de campo, como una alternativa eficiente para la propagación clonal de esta especie, permitiendo contar a mediano plazo con una metodología para la producción a gran escala y disponer de suficiente material de siembra para promover el cultivo de arándano e incentivar la diversificación de la actividad agrícola en el país.

El presente proyecto de titulación se encuentra vinculado con el segundo objetivo de Desarrollo Sostenible de las Naciones Unidas (ODS 2) denominado “Hambre cero”. Además, está relacionado con la línea de investigación de la Universidad Nacional de Loja titulada “*Sistemas agropecuarios sostenibles para la soberanía alimentaria*”. Asimismo, se alinea con la línea de investigación de la Carrera de Agronomía “*Tecnologías para la producción y posproducción agrícola sostenible*”, ya que se ha desarrollado un protocolo de micropropagación para la producción masiva de plántulas de arándano de alta calidad.

3.1. Objetivo General

Generar un protocolo para la propagación *in vitro* de arándano a partir de explantes de campo.

3.2. Objetivos Específicos

- Establecer un protocolo de desinfección de explantes de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) cv. Biloxi, aplicando distintas concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempos de inmersión.
- Evaluar dos fórmulas de medio de cultivo y la interacción hormonal para la propagación *in vitro* de arándano.

4. Marco teórico

4.1. El cultivo de arándano

4.1.1. Descripción taxonómica y botánica de la especie.

El arándano taxonómicamente se clasifica así:

- Reino: Plantae
- División: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Orden: Ericales
- Familia: Ericaceae
- Género: *Vaccinium*
- Especie: *Vaccinium corymbosum* L. cv. Biloxi

El arándano de la variedad biloxi es una planta con tallos erectos, vigorosos y productivos. La de fruta de esta variedad madura tempranamente, presenta un tamaño de baya mediano, buen color, firmeza y sabor. Requiere pocas horas frío y se caracterizan por alcanzar altos rangos de grados Brix. Además, esta variedad es difícil de cultivar, pero en contraparte tiene como cualidades un delicioso y dulce sabor, gran tamaño, textura firme y consistente (Baldomero *et al.*, 2017).

4.1.2. Producción mundial

En 2021, se sembraron 126 146 hectáreas de arándanos a nivel mundial, y se estima que la superficie de plantación mundial de arándanos es de aproximadamente 0,13 millones de hectáreas en 2022 (Ortiz, 2022). Entre 2010 y 2019, la producción mundial de arándanos se duplicó de 439 000 t y 26 naciones productoras, a cerca de 1 millón de t y 30 países (USDA, 2021). En 2021, en el mundo se importaron 429 000 t de arándanos, lo que supone un 3,17% más que el año anterior y una media anual de 30 200 toneladas (Ortiz, 2022).

4.1.3. Cultivo de arándano en la provincia de Loja

La zona de producción de este cultivo en la provincia de Loja es el cantón Zapotillo, donde gracias a la apertura de este cultivo al mercado internacional se benefician directamente alrededor de 300 familias zapotillanas que laboran en la empresa Hortifrut Ecuador S.A (MAG, 2022).

4.2. Métodos de propagación

La propagación de arándano se realiza por semilla, estacas y propagación *in vitro*. La propagación por semillas es un método utilizado generalmente para investigar nuevas variedades. Mientras que la propagación por esquejes tiene un éxito limitado debido a las malas características de enraizamiento. Por otro lado, la micropropagación es la metodología más exitosa y se aplica de distintas maneras dependiendo de la especie; su principal ventaja es que el material obtenido por esta técnica es libre de enfermedades (AGROBIT, 2022).

4.2.1. Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales se refiere a un conjunto de procedimientos que implican el aislamiento y cultivo de diferentes partes de la planta, como células, tejidos y órganos, en condiciones físicas, químicas y ambientales controladas de forma artificial, esto permite que expresen su capacidad morfométrica. El cultivo y manipulación del explante, se llevan a cabo bajo condiciones de total asepsia para evitar contaminación microbiana (Hussain *et al.*, 2012).

Este método se fundamenta en el principio de totipotencia de las células vegetales, que se refiere a la capacidad que tiene una sola célula para expresar el genoma completo a través de la división celular. Además, este aspecto es importante en la técnica de cultivos vegetales porque las células vegetales tienen la capacidad de alterar su metabolismo, su crecimiento y su desarrollo para regenerar plantas completas a partir de cualquier segmento de la planta (Hussain *et al.*, 2012).

4.2.1.1. Etapas del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. El proceso de cultivo de tejidos incluye cinco fases:

a) ***Selección de la especie.*** Las plantas seleccionadas deben presentar características sobresalientes a las otras plantas. Las plantas escogidas deben ser sanas y vigorosas (Sharry *et al.*, 2015).

b) ***Desinfección del material vegetal.*** Se emplean detergentes y desinfectantes específicos que penetren en el tejido y eliminen cualquier agente contaminante presente en el material vegetal. Es importante tener en cuenta que no todos los explantes requieren el mismo proceso de desinfección, dado que la morfología y el tipo de tejido pueden variar, al igual que las condiciones ambientales a las que están expuestos (Sharry *et al.*, 2015).

1) Hipoclorito de sodio. El hipoclorito de sodio (NaClO) es ampliamente utilizado en el cultivo de tejidos vegetales debido a su capacidad de eliminar microorganismos infecciosos como bacterias y hongos exógenos, lo que aumenta la tasa de establecimiento *in vitro* del material vegetal. El NaClO es un producto eficaz, económico y fácilmente disponible en el mercado, y es probablemente uno de los desinfectantes más antiguos y conocidos que libera halógenos. Sin embargo, las tasas de éxito en la esterilización de los explantes puede variar según el tipo de tejido, la fuente y otros factores. Aunque es muy efectivo contra una amplia gama de microorganismos, su actividad se ve disminuida en presencia de materia orgánica (Ovando, 2012).

c) Introducción del material *in vitro*. Una vez que se ha llevado a cabo la desinfección de los explantes, dependiendo del material seleccionado, se colocan en un medio de cultivo estéril. Después de aproximadamente una semana o quince días, comienza el proceso de brotación o regeneración de nuevos tejidos, dando inicio al ciclo de un cultivo *in vitro* (Sharry *et al.*, 2015).

d) Desarrollo del tejido. Usualmente, la multiplicación *in vitro* ocurre a través de tres métodos principales: la embriogénesis somática, propagación clonal y formación de brotes adventicios. La embriogénesis somática consiste en la formación de embriones sin requerimiento de la fusión de gametos, esta alternativa de propagación *presenta* enormes ventajas, debido a que cada célula contiene la información necesaria para dar origen a una planta completa. La propagación clonal es el método más común de multiplicación en la mayoría de las especies vegetales y puede resultar en la proliferación de brotes dependiendo del medio de cultivo y de la planta. La organogénesis directa se refiere a la formación de brotes a partir de cualquier tejido de la planta, mientras que la organogénesis indirecta ocurre cuando los brotes se generan a partir del desarrollo de un callo formado en el explante (Sharry *et al.*, 2015).

e) Enraizamiento y acondicionamiento. Durante el proceso de acondicionamiento de las plántulas en el laboratorio, es necesario monitorear la intensidad lumínica, la temperatura y las respuestas fisiológicas. La temperatura óptima para este proceso varía entre 25 y 28 °C, dependiendo de la especie. En algunas ocasiones durante la etapa de multiplicación los brotes pueden generar la formación de raíces (Sharry *et al.*, 2015).

f) Adaptación de las plántulas. Las plántulas generadas *in vitro* que son transferidas al exterior; necesitan pasar por un proceso de adaptación con el fin de proporcionarles estabilidad para ser plantadas en campo (Sharry *et al.*, 2015).

4.2.1.2. *Medios de cultivo.*

El éxito de la propagación *in vitro* está directamente relacionado e influenciado por la composición química de los medios de cultivo utilizados. Para que las plantas puedan crecer y desarrollarse adecuadamente, es esencial que absorban del suelo cantidades significativas de macronutrientes como sales de nitrógeno, potasio calcio, fósforo, magnesio, azufre y micronutrientes como sales de hierro, manganeso, zinc, boro, cobre, molibdeno y cobalto. Estos elementos se encuentran presentes en el medio de cultivo, junto con carbohidratos; usualmente la sacarosa que reemplaza el carbono que la plantas normalmente fijan de la atmósfera a través de la fotosíntesis. Además, el medio de cultivo contiene en pequeñas cantidades compuestos orgánicos como vitaminas, aminoácidos y reguladores de crecimiento (Rodríguez & Zhurbenko, 2018).

a) **Macronutrientes.** El nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre conforman los macronutrientes requeridos por las células vegetales para alcanzar un crecimiento adecuado estructuralmente. Las dosis de estos elementos varían dependiendo del medio de cultivo (Rodríguez & Zhurbenko, 2018).

b) **Micronutrientes.** En los medios de cultivo realizados por algunos investigadores, los micronutrientes más utilizados son: hierro, manganeso, zinc, cobre, boro y molibdeno. Su nombre refleja la baja concentración que las plantas requieren para su crecimiento (Rodríguez & Zhurbenko, 2018).

c) **Reguladores de crecimiento.** Además de los nutrientes y las condiciones físicas, el crecimiento, desarrollo y reproducción de las plantas también requiere sustancias endógenas conocidas como hormonas vegetales. Estas hormonas se producen a través de varias vías metabólicas esenciales y regulan la expresión de factores de transcripción y genes específicos para llevar a cabo sus funciones. Los medios de cultivo utilizados para la micropropagación pueden contener sustancias sintéticas similares a las hormonas vegetales, llamadas reguladores de crecimiento vegetal. Estos reguladores son cruciales para el metabolismo de las plantas, distribución de solutos, crecimiento y fisiología. Además, regulan la expresión génica internamente, similar a una hormona natural (Bisht *et al.*, 2018).

1) **Auxinas.** Tienen diversas funciones biológicas, entre las que se encuentran la expansión de las células del tallo y los coleóptilos. También, desempeñan funciones en la

división celular y promueven el desarrollo de callos, de los cuales posteriormente se generan crecimientos radiculares (Bisht *et al.*, 2018).

- **El Ácido indol acético.** Es una auxina natural que está presente en la mayoría de las plantas y regula las hormonas vegetales que controlan varios procesos de desarrollo en las plantas (Bisht *et al.*, 2018).
- **Ácido indol butírico.** Se considera un estimulador del crecimiento vegetal y se utiliza para iniciar la formación y desarrollo de raíces en la micropropagación. Permite la formación de masas de células indiferenciadas conocidas como callos (Bisht *et al.*, 2018).

2) **Citoquininas.** Estas hormonas promueven la división celular, la embriogénesis, la formación de brotes axilares y adventicios y la inhibición de la formación de raíces (Bisht *et al.*, 2018).

- **Zeatina.** Es fundamental en las plantas para los procesos de desarrollo, como el crecimiento vegetativo y la inducción de la floración (Bisht *et al.*, 2018).
- **2ip.** Es una citoquinina a base de adenina que generalmente se considera que es el segundo más potente de todas las citoquininas detrás de Trans-Zeatina (Bisht *et al.*, 2018).
- **Kinetina.** Es una fitohormona de citoquinina de tipo adenina utilizada para inducir la formación de callos y para regenerar tejidos de plantas a partir de callos (Bisht *et al.*, 2018).

Las citoquininas, como 2iP, Zeatina, Kinetina, 6-Bencilaminopurina (BAP) son usadas en la micropropagación para promover el crecimiento y la multiplicación de los brotes. Con el uso de este tipo de hormonas se espera una mayor generación de brotes por explante y un crecimiento más rápido de estos (Aquiye, 2020).

d) **Sacarosa.** El azúcar es esencial en un medio nutritivo porque permite un rápido crecimiento heterotrófico y desarrollo de los tejidos, ya que la producción de carbohidratos y de energía por la fotosíntesis es reducido debido a los bajos niveles de iluminación en los cuartos de incubación (Capó *et al.*, 2004).

e) **Materiales solidificantes.** Actúan como agentes de soporte porque son compuestos gelificantes como: el agar, gelrite y fitogel. También se incluye la lana de vidrio y papel filtro (Capó *et al.*, 2004).

f) **Explante.** El término explantes se refiere a cualquier parte vegetal que ha sido separada de la planta original, como fragmentos de hojas, tallos, raíces y órganos como:

semillas, anteras, ovarios, hojas y raíces completas, así como estructuras individuales como anteras y ovarios, o también células individuales (Ovando, 2012).

1) **Oxidación fenólica del explante.** La oxidación fenólica es un fenómeno común en los tejidos vegetales que ocurre como resultado de una lesión o herida. Este proceso se caracteriza por un oscurecimiento del tejido y suele ser seguido por una inhibición del crecimiento e incluso puede llevar a la necrosis y muerte del tejido (Ovando, 2012).

4.2.1.3. Principales medios de cultivo.

a) **Murashige y Skoog (MS).** Fue desarrollado en 1962 por los científicos Toshio Murashige y Folke K. Skoog. Este medio contiene macronutrientes, micronutrientes y vitaminas, lo que lo hace apto para la mayoría de las especies vegetales en el cultivo *in vitro* de tejidos, excepto para aquellas más sensibles a la salinidad debido a su alta concentración de sales (Murashige y Skoog, 1962; Prieto *et al.*, 2005).

b) **Woody Plant Medium (WPM).** Fue formulado originalmente en 1981 por Lloyd y McCown y es ampliamente utilizado para la micropropagación de muchas plantas. Esta formulación consiste en una mezcla de nutrientes inorgánicos, vitaminas, aminoácidos y sales. El WPM provee todos los macro y microelementos esenciales para el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales (Lloyd y McCown, 1981).

4.2.1.4. Importancia del cultivo de tejidos vegetales.

El cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales es una tecnología interesante para la producción de plantas y productos naturales de interés por las siguientes razones:

- Propagación de especies de plantas que presentan dificultades mediante los métodos tradicionales.
- Producción de plantas con sanidad controlada, característica que le permite incrementar los rendimientos.
- Establecimiento de un sistema de producción definido según las demandas del mercado.
- Creación de programas de mejoramiento genético más rápidos que los métodos tradicionales, como la producción de plantas transgénicas resistentes a patógenos, herbicidas o estrés abiótico, y con una mejor calidad nutricional, entre otras aplicaciones (INIA, 2016).

4.2.2. Antecedentes sobre micropropagación de arándano

4.2.2.1. Propagación *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) a partir de yemas axilares.

En un estudio realizado en Colombia, se investigó la propagación *in vitro* a partir de yemas axilares del arándano. El objetivo fue determinar la influencia de la concentración de la hormona zeatina en la generación de brotes en explantes de arándano. Los resultados mostraron que una concentración de zeatina de 1 mg L⁻¹ produjo el mayor número de brotes por esqueje, mientras que una concentración de 2 mg L⁻¹ tuvo un mayor efecto en el crecimiento o elongación de dichos brotes (Lerma *et al.*, 2019).

4.2.2.2. Protocolo de micropropagación de arándano nativo de Costa Rica (*Vaccinium consanguineum*).

En otro estudio realizado en Costa Rica, se validó la fase de establecimiento *in vitro* del arándano nativo. En esta etapa se utilizó una combinación de jabón enzimático (5 ml.l⁻¹) e hipoclorito de sodio (3% a.i.) como desinfectante más efectivo. Se evaluó en el medio de cultivo Woody Plant Medium (WPM) al 50 % el efecto de tres reguladores, BA (0, 3, 5, 10, 15 y 20 mg L⁻¹), Z (0, 0,1, 0.5 mg L⁻¹), se observó que ambas citoquininas fueron efectivas en concentraciones de 3 mg L⁻¹ y 0,1 mg L⁻¹ respectivamente (Jiménez & Abdelnour, 2017).

4.2.2.3. Establecimiento *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.).

En otro estudio realizado en Costa Rica, se llevó a cabo el establecimiento *in vitro* de arándano. Se sometieron los esquejes a cuatro métodos de desinfección diferentes y se evaluó el efecto de las citoquininas 2iP, BAP y CPPU en una concentración de 2,5 mg L⁻¹ sobre la brotación de las yemas. Se encontró que el uso de brotes de plantas maduras y la esterilización con hipoclorito de sodio al 1,5 % y Tween 20 al 0,1 % durante 40 minutos produjo el mayor porcentaje de explantes estériles, y la adición de CPPU resultó en el mayor número de brotes. Sin embargo, 2ip promovió el crecimiento máximo de los brotes a partir del explante inicial (Hine & Abdelnour, 2013).

5. Metodología

5.1. Localización del estudio

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Facultad Agropecuaria de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional de Loja. Ubicado en el bloque 15 del campus, a 3 km al sur de la ciudad de Loja; en las siguientes coordenadas geográficas: 04°00'00" Latitud Sur y 79°12'00" Longitud Oeste (Figura 1).



Figura 1. Mapa de la ubicación del Laboratorio de Micropropagación Vegetal de la Universidad Nacional de Loja.

5.2. Metodología general

El objetivo de esta investigación fue establecer un protocolo para la propagación *in vitro* de arándanos a partir de la optimización de un método de desinfección con distintas concentraciones y tiempos de inmersión en hipoclorito de sodio, así como la evaluación de dos fórmulas de medio de cultivo y la interacción hormonal para la propagación *in vitro* de arándano en el laboratorio de micropropagación vegetal en la Universidad Nacional de Loja. Esta investigación es de tipo experimental, ya que se manipularon intencionalmente las variables independientes. También, posee un enfoque cuantitativo porque se recolectaron y analizaron datos de carácter numérico sobre las variables estudiadas. De acuerdo a las características de

este trabajo, el alcance de la investigación es descriptiva y causal comparativa, pues se indagaron las relaciones causa-efecto entre variables independientes y dependientes.

5.3. Diseño experimental

5.3.1. Diseño experimental para el primer objetivo.

En este estudio se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), con un arreglo bifactorial, con 6 tratamientos y 5 repeticiones (Tabla 1, Figura 2).

El modelo matemático utilizado para este estudio es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha \times \beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

En el cual:

Y_{ijk} = Respuesta de las k repeticiones en los i niveles del factor de la concentración de NaClO y j nivel del factor de tiempo de inmersión.

μ = Media general de las observaciones.

α_i = efecto de los i – ésimo niveles del factor de concentración del NaClO.

β_j = efecto de los j – ésimo niveles del factor de tiempo de inmersión.

$(\alpha \times \beta)_{ij}$ = Efecto de la interacción entre el nivel i de la concentración del NaClO con el nivel j del tiempo de inmersión.

ϵ_{ijk} = Error asociado a la ijk observación, que se supone normal independientemente distribuida con esperanza 0 y varianza σ^2

Tabla 1. Tratamientos de desinfección; concentraciones y tiempos de inmersión para un protocolo de propagación *in vitro* de arándano.

N° de Tratamiento	Concentración	Tiempo de inmersión
T1	(NaClO) 10%	10 minutos
T2	(NaClO) 10%	15 minutos
T3	(NaClO) 15%	10 minutos
T4	(NaClO) 15%	15 minutos
T5	(NaClO) 20%	10 minutos
T6	(NaClO) 20%	15 minutos

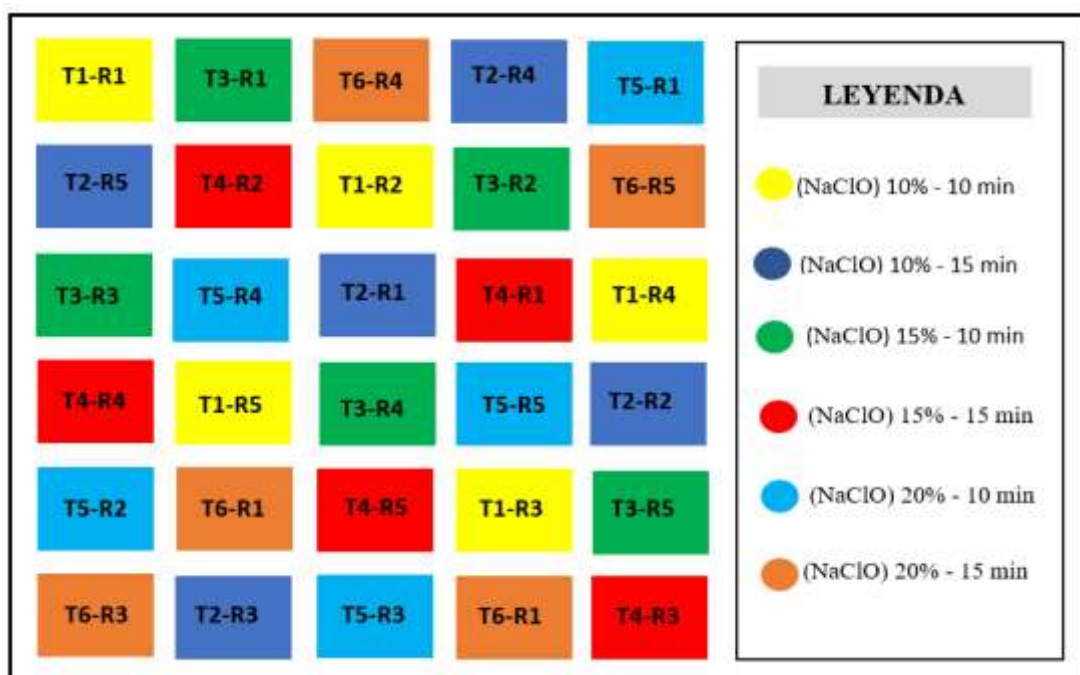


Figura 2. Tratamientos ensayados para evaluar la desinfección de explantes de arándano.

La unidad experimental estuvo constituida por 4 tubos de ensayo cada uno formado por 1 explante, en cada tratamiento se utilizaron 20 explantes, dando un total de 120 explantes en el ensayo (Tabla 2).

Tabla 2. Especificaciones del diseño experimental para la desinfección de explantes de arándano, provenientes de campo.

Unidad experimental (conjunto de tubos de ensayo)	4
Número de tratamientos	6
Número de repeticiones	5
Número de total de tubos de ensayo por tratamiento	20
Número total de unidades experimentales del ensayo	30
Número total de tubos de ensayo para el ensayo	120

- **Hipótesis del modelo.**

HO = A mayor concentración de hipoclorito de sodio no existe disminución en el porcentaje de contaminación de explantes de arándano.

H1 = A mayor concentración de hipoclorito de sodio existe disminución en el porcentaje de contaminación de explantes de arándano.

5.3.2. *Diseño experimental para el segundo objetivo.*

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), con un arreglo bifactorial, con 4 tratamientos incluyendo dos tratamientos control y 5 repeticiones (Tabla 3, Figura 3).

El modelo matemático utilizado para este estudio es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha \times \beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

En el cual:

Y_{ijk} = Respuesta de las k repeticiones en los i niveles del factor de medio de cultivo y j nivel del factor de hormona.

μ = Media general de las observaciones.

α_i = efecto de los i – ésimo niveles del factor de medio de cultivo.

β_j = efecto de los j – ésimo niveles del factor de hormona.

$(\alpha \times \beta)_{ij}$ = Efecto de la interacción entre el nivel i de la concentración del NaClO con el nivel j del tiempo de inmersión.

ε_{ijk} = Error asociado a la ijk observación, que se supone normal independientemente distribuida con esperanza 0 y varianza σ^2 .

Tabla 3. Tratamientos de establecimiento: dos fórmulas de medio de cultivo y la interacción hormonal para la propagación *in vitro* de arándano.

Nº de Tratamiento	Medio de Cultivo	Hormona
T1	Murashige y Skoog	Kinetina (2 mg L ⁻¹)
T2	Murashige y Skoog	2ip (2 mg L ⁻¹)
T3	Woody Plant Medium	Kinetina (2 mg L ⁻¹)
T4	Woody Plant Medium	2ip (2 mg L ⁻¹)
T5	Testigo (Murashige y Skoog)	Kinetina 0 – 2ip 0
T6	Testigo (Woody Plant Medium).	Kinetina 0 – 2ip 0

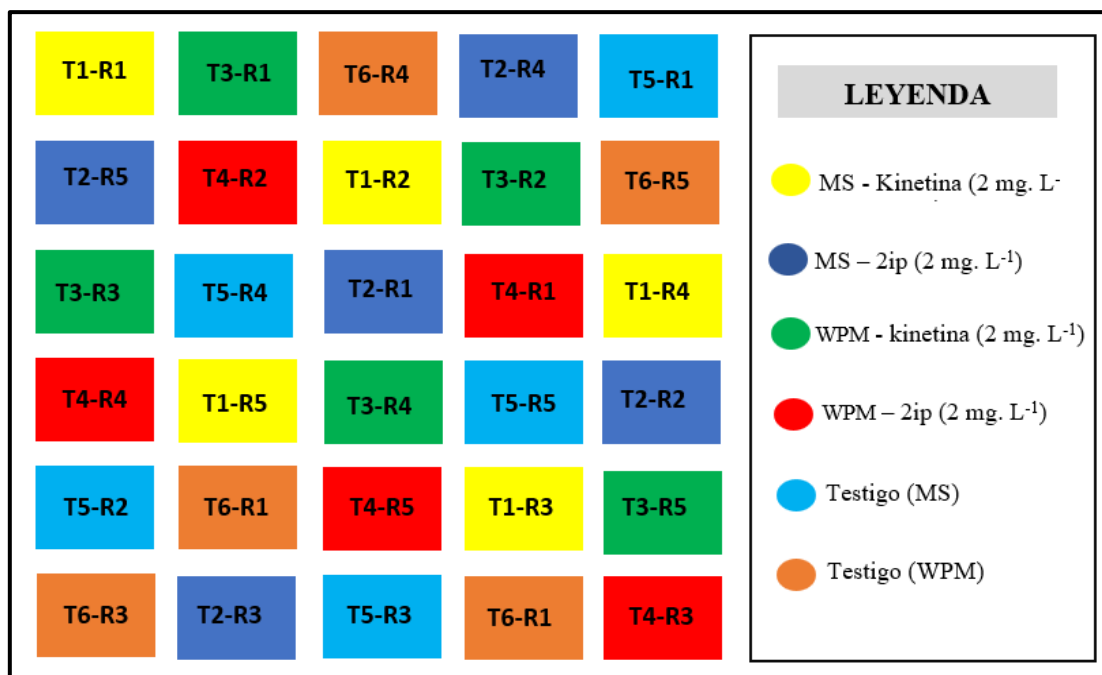


Figura 3. Tratamientos aplicados para la inducción de organogénesis directa, a partir de explantes de arándano.

La unidad experimental estuvo constituida por 5 frascos de vidrio cada uno formado por 2 explantes, en cada tratamiento se utilizaron 50 explantes, dando un total de 250 explantes en el ensayo (Tabla 4).

Tabla 4. Especificaciones del diseño experimental para la inducción de organogénesis directa en explantes de arándano.

Unidad experimental (conjunto de frascos)	5
Número de tratamientos	6
Número de repeticiones	5
Número de total de frascos por tratamiento	25
Número total de unidades experimentales del ensayo	50
Número total de frascos para el ensayo	150

- **Hipótesis del modelo.**

HO = No existe efecto de las fórmulas de medio de cultivo y la interacción hormonal para la formación de brotes en la propagación *in vitro* de arándano.

H1 = Existe efecto de las fórmulas de medio de cultivo y la interacción hormonal para la formación de brotes en la propagación *in vitro* de arándano.

5.4. Metodología para establecer un protocolo de desinfección explantes de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) cv. Biloxi, aplicando diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempos de inmersión”.

5.4.1. Selección y recolección del material vegetal en campo.

Se utilizó como fuente de explantes; plantas de la variedad Biloxi cultivadas en campo en la quinta experimental Docente La Argelia de la Universidad Nacional de Loja. Se seleccionaron plantas madre con características fenotípicas y fitosanitarias sobresalientes a las demás plantas y para garantizar una mayor división celular se eligieron plantas jóvenes. Estas plantas se trataron con fungicida (Azoxystrobin + flutriafol 1,5 ml L⁻¹) un mes antes de la colecta. Se recolectaron varetas de la parte media de la planta, con una longitud de 20 cm y alrededor de 10 yemas útiles.

5.4.2. Preparación del medio de cultivo de Murashige y Skoog

Se utilizó el medio de cultivo MS sólido suplementado con sales minerales: tiamina 5 mg L⁻¹, mio-inositol 100 mg L⁻¹, sacarosa 20 g L⁻¹ (como fuente exógena de carbono); 150 mg L⁻¹ ácido cítrico, 100 mg L⁻¹ ácido ascórbico (agentes antioxidantes), agar 5,8 g L⁻¹ (agente solidificante). El pH del medio se ajustó a 5,8 con hidróxido de sodio (NaOH).

Se distribuyeron 4 ml de medio de cultivo en cada tubo de ensayo y se esterilizaron en autoclave a una temperatura de 120 °C y una presión de 1,50 kg cm² durante 20 minutos.

5.4.3. Desinfección e inoculación de los explantes

Para la desinfección del material vegetal, se deshojaron las varetas y se lavaron los brotes con agua corriente y detergente en una bandeja. Después se sumergieron en una solución fungicida (Azoxystrobin + frutiafol 1,5 ml L⁻¹) y se dejó en agitación por 3 horas. Se realizaron 2 a 3 enjuagues con agua destilada, después de cada desinfección (Anexo 1).

El objetivo de esta fase fue evaluar el efecto del hipoclorito de sodio (NaClO) como desinfectante, en concentraciones de 10 %, 15 % y 20 % y tiempos de inmersión de 10 y 15 minutos. La segunda fase de desinfección de los explantes de arándano se realizó en condiciones asépticas en la cámara de flujo laminar, sumergiéndolos en alcohol al 70° por 1 minuto, seguido de enjuagues con agua destilada autoclaveada (antioxidante; ácido ascórbico + ácido cítrico) (Anexo 2). A continuación, los explantes se sumergieron en la solución desinfectante correspondiente a cada tratamiento. Después, se inoculó cada explante en un tubo

de ensayo con 4 ml de medio de cultivo Murashige y Skoog, cuidando la polaridad (con la zona apical hacia arriba y la radical sobre el medio de cultivo). Cada tubo de ensayo se etiquetó según su tratamiento y luego se colocaron en el cuarto de incubación a 22°C, con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad y humedad relativa del 85 %, durante un periodo de 30 días (Anexo 3 y 4).

5.4.4. Variables de evaluación. Las variables evaluadas fueron:

5.4.4.1. Porcentaje de contaminación promedio.

La evaluación se basó en la presencia o ausencia de estructuras fungosas, bacterias y/o levaduras en el medio de cultivo en cualquier nivel de intensidad. Estas evaluaciones se realizaron dos veces por semana (los lunes y viernes), a partir del quinto día de la inoculación. Luego se hizo un análisis final para determinar qué tratamiento presentó la menor contaminación. Los explantes contaminados se registraron utilizando la siguiente fórmula:

$$\%Contaminación = \frac{\text{Explantes contaminados}}{\text{Total de explantes}} \times 100$$

5.4.4.2. Porcentaje de oxidación fenólica.

Se evaluaron los tejidos que presentaron oscurecimiento (color café), como resultado de la acumulación de fenoles producidos por un estrés oxidativo. Las evaluaciones se registraron a las 120 horas posteriores a la inoculación y se hizo un seguimiento cada 5 días durante un mes. Se calculó el porcentaje de explantes fenolizados respecto al total de explantes inoculados, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\%Fenolización = \frac{\text{Explantes fenolizados}}{\text{Total de explantes}} \times 100$$

5.4.4.3. Tasa total de pérdida.

Se evaluaron de forma visual contabilizando el número de explantes muertos, por 100, a los 30 días de la inoculación (Anexo 5).

5.5. Metodología para evaluar dos fórmulas de medio de cultivo y la interacción hormonal para la propagación *in vitro* de arándano”

Una vez se logró ajustar el protocolo de desinfección, se seleccionó el mejor resultado obtenido en esta fase para desinfectar los explantes y proceder a la segunda fase del proyecto. En esta etapa, se compararon dos medios de cultivo (medio Murashige y Skoog y el medio Woody Plant Medium) y se evaluó el efecto de dos reguladores de crecimiento (Kinetina y 2ip) sobre el desarrollo de explantes de arándano, con la finalidad de determinar el balance hormonal y el medio de cultivo más adecuado para establecer un protocolo específico para esta especie (Anexo 6).

Para la introducción del material vegetal *in vitro*, se cortaron las varetas y se tomaron segmentos de tallo con dos yemas axilares de 1,5 cm de longitud como explantes.

5.5.1. Establecimiento de segmentos nodales o yemas.

El proceso de establecimiento de explantes de arándano se realizó bajo condiciones asépticas en la cámara de flujo laminar. Se sembraron segmentos nodales en frascos con 25 ml de medio de cultivo: WPM y MS, ambos suplementados con dos reguladores de crecimiento del tipo citoquininas (kinetina y 2ip) a una concentración de 2 mg L⁻¹ cada una, para inducir la formación de brotes. Como tratamientos control, se sembraron explantes en medios de cultivo basal MS y WPM sin reguladores de crecimiento (Anexo 8 y 9). Los frascos se sellaron con parafilm, se etiquetaron con los respectivos tratamientos y se incubaron a 22°C, con una iluminación de 3000 lux, un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad y humedad relativa del 85%. El periodo de establecimiento tomó un tiempo de 30 y 60 días para la generación y desarrollo de brotes respectivamente (Anexo 7).

5.5.2. Variables de evaluación.

Las variables que se evaluaron en este objetivo, fueron las siguientes:

5.5.2.1. Porcentaje de brotación.

Se consideró que un explante estaba brotado cuando el brote alcanzó una longitud aproximada de 1 cm y presentó primordios foliares. El número de explantes brotados se contabilizó en base a la fórmula siguiente:

$$\% \text{ Brotación} = \frac{N^{\circ} \text{ Explantes brotados}}{\text{Total de explantes}} \times 100$$

5.5.2.2. Longitud del brote.

Se midió la longitud del brote de cada explante con una regla graduada en centímetros. La medición se realizó desde la base del brote hasta el ápice de la hoja, al finalizar el periodo de evaluación.

5.5.2.3. Número de hojas.

Se registró el número de hojas que tenía cada explante a los 30 y 60 días después de la siembra (Anexo 10).

5.6. Análisis de estadístico

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos en las variables evaluadas durante la fase de desinfección y establecimiento *in vitro* de arándano, se utilizó el software InfoStat. Se realizó un análisis de varianza ANOVA y se aplicó el test de Tukey para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos, con un nivel de significancia de 0,05%. Además, se comprobó que se cumplieran los supuestos de homogeneidad y normalidad para cada una de las variables en los distintos ensayos.

6. Resultados

6.2. Establecer un protocolo de desinfección explantes de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) cv. Biloxi, aplicando distintas concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempos de inmersión.

6.2.1. Porcentaje de contaminación

La figura 4 muestra el porcentaje de contaminación de los explantes de arándano a los 30 días de la siembra. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos (F:33,22 y p-valor<0,0001) (Anexo 12), donde los tratamientos con 10 minutos de inmersión en NaClO al 15 % (T3) y al 20% (T5) presentaron los menores porcentajes de contaminación, con un 20% de explantes contaminados. Por el contrario, los tratamientos con 15 minutos de inmersión en NaClO al 10% (T2), al 15% (T4) y al 20% (T6) mostraron el mayor porcentaje de contaminación, con 30 % de explantes contaminados.

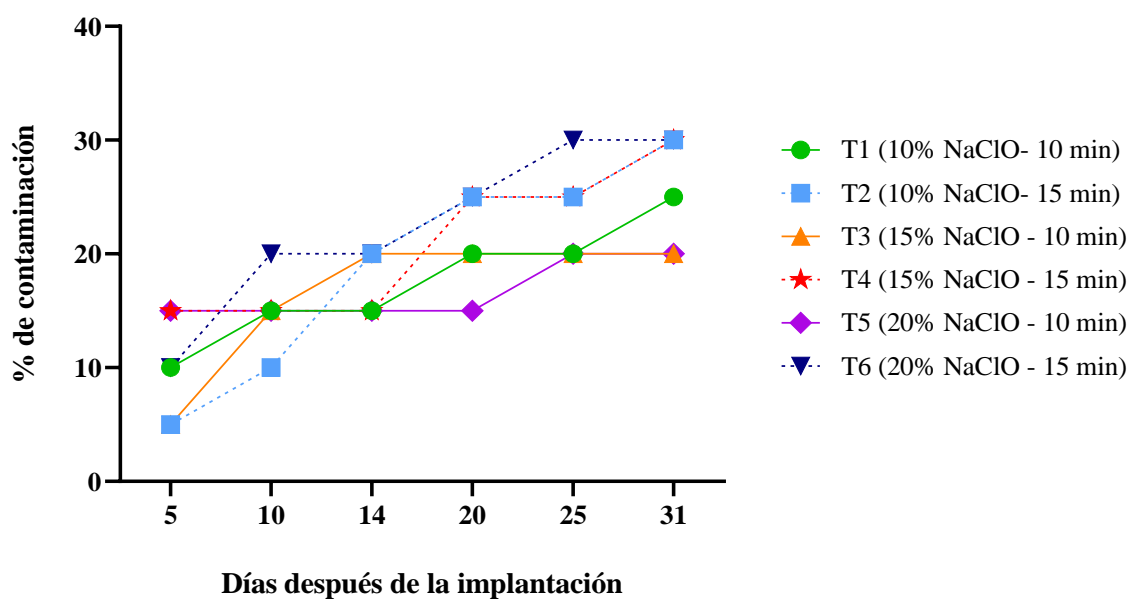


Figura 4. Porcentaje de explantes sanos de arándano en función de la concentración de NaClO y el tiempo de inmersión.

Se detectó que la contaminación en los seis tratamientos fue causada por la presencia de hongos tanto en el explante como en el medio de cultivo, además se observó que únicamente uno de los explantes presentaba contaminación bacteriana. El análisis de las muestras realizado en el laboratorio de sanidad vegetal de la Universidad Nacional de Loja mostró la presencia de hifas de hongos no fitopatógenos y bacterias no fitopatógenas Gram + (Figura 5) (Anexo 11).

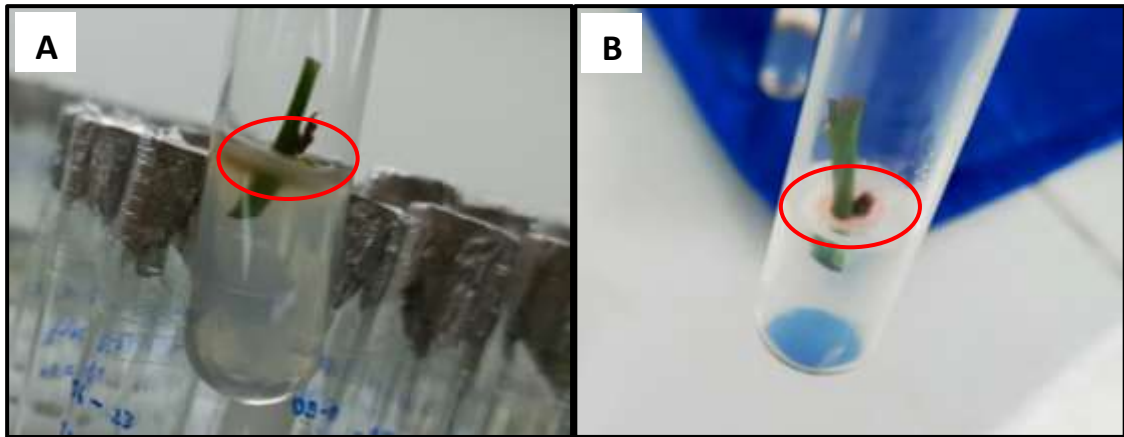


Figura 5. A) Contaminación de explantes de arándano por hongo. B) Contaminación de explantes de arándano por bacteria.

6.2.2. Porcentaje de oxidación fenólica de los explantes

Como se observa en la figura 6, no se encontraron diferencias en relación al tiempo de inmersión; sin embargo, se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos ($F:8,28$ y $p\text{-valor}<0,0021$) (Anexo 13), por efecto de la concentración de NaClO. Los tratamientos T1 y T2 (10 % de NaClO) y T3 y T4 (15% de NaClO) presentaron el menor porcentaje de oxidación fenólica, con un 40 % y 45% respectivamente, mientras que los tratamientos T5 y T6 (20 % de NaClO) obtuvieron el mayor porcentaje de fenolización, con un 70 % y 75 % de explantes fenolizados.

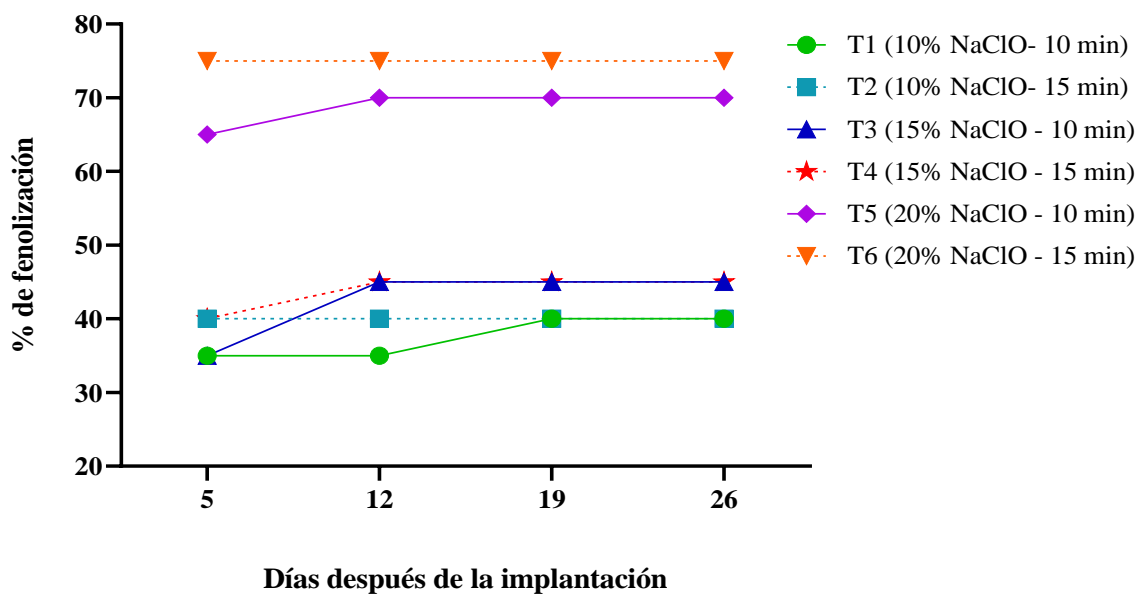


Figura 6. Porcentaje de oxidación fenólica de explantes de arándano en función de la concentración de NaClO y el tiempo de inmersión.

6.2.3. Tasa total de pérdida

En la figura 7, se muestran los resultados del porcentaje de pérdida de explantes de arándano a los 30 días de la implantación, en donde el tratamiento T3 (15 % NaClO y 10 min) presentó el menor porcentaje de pérdida con un 20 %, en contraste con el tratamiento T6 (20 % NaClO y 15 min) que tuvo un porcentaje de pérdida de 45 %. Según el análisis estadístico se determinó que existe diferencia significativa entre tratamientos (F:7,96 y p-valor<0,0001) (Anexo 14).

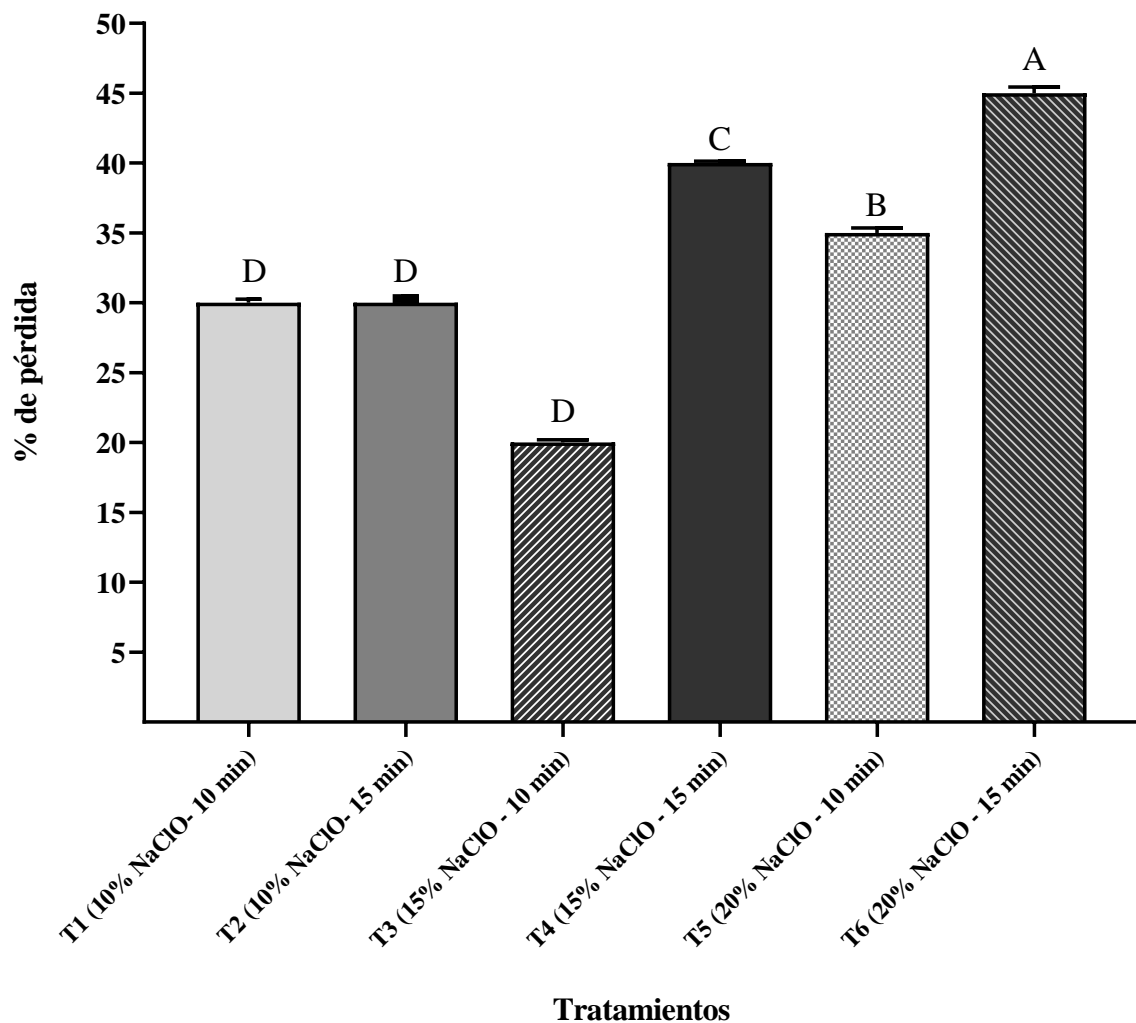


Figura 7. Porcentaje de pérdida de explantes de arándano por cada tratamiento a los 30 días de evaluación. Medias con letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

6.3. Evaluar dos fórmulas de medio de cultivo y la interacción hormonal para la propagación *in vitro* de arándano.

6.3.1. Porcentaje de brotación

Como se muestra en la figura 8, se encontró una diferencia significativa ($F:35,89$ y $p\text{-valor}<0,0001$) (Anexo 15), en el porcentaje de brotación al analizar la interacción hormonal de 2ip y kinetina a una misma concentración (2 mg L^{-1}); sin embargo, no se observó diferencia al analizarse el efecto del medio de cultivo. Los tratamientos que presentaron los mejores resultados fueron T5 (Testigo MS), T2 ($\text{MS} - 2\text{ip } 2\text{ mg L}^{-1}$) y T4 ($\text{WPM} - 2\text{ip } 2\text{ mg L}^{-1}$) con un promedio de brotación del 80 % y 75 % respectivamente. Por otro lado, el tratamiento T1 ($\text{MS} - \text{kinetina } 2\text{ mg L}^{-1}$) mostró el menor porcentaje de brotación, con solo un 30 % de explantes brotados.

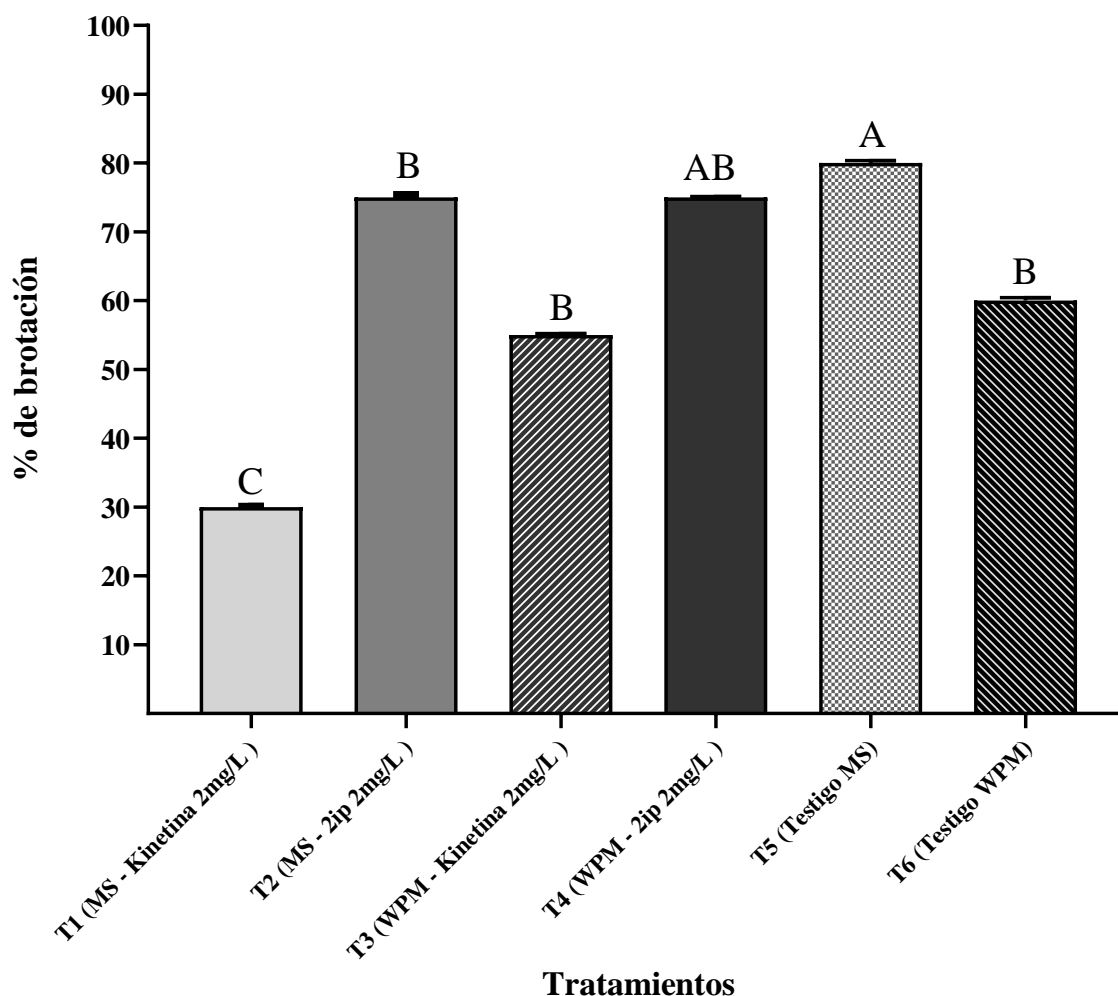


Figura 8. Porcentaje de explantes de arándano brotados en función de dos fórmulas de medio de cultivo y la interacción hormonal.

6.3.2. Longitud del brote

De acuerdo con la figura 9, el T6 (Testigo WPM) alcanzó el valor promedio más alto con 5,08 cm a los 60 días; frente al T1 (MS – Kinetina 2 mg L⁻¹) que registró el valor promedio más bajo, con una longitud promedio del brote de 0,62 cm. Al aplicar el análisis estadístico, se determinó que no hubo diferencias significativas en relación a la hormona utilizada; pero sí, se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos (F:12,26 y p-valor<0,0018) (Anexo 16), por efecto del medio de cultivo. La figura 10 muestra los brotes desarrollados en función del medio utilizado, a los 60 días de evaluación.

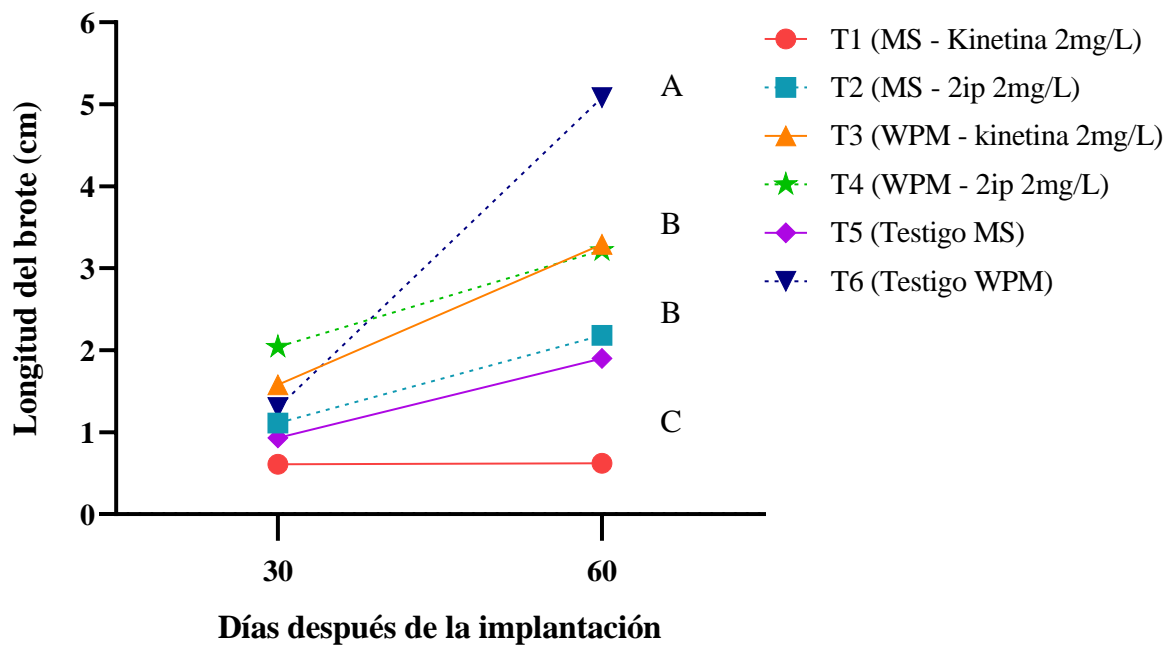


Figura 9. Longitud del brote en función de dos fórmulas de medio de cultivo y la interacción hormonal.

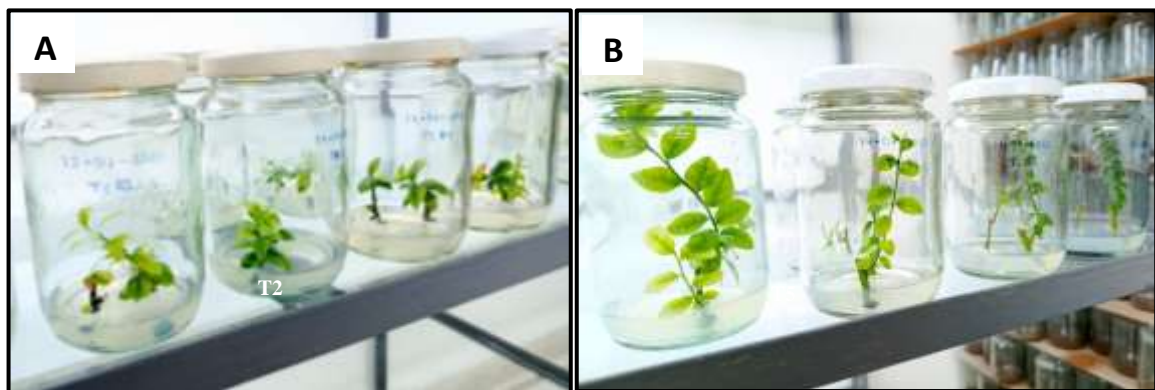


Figura 10. A) Longitud del brote con medio de cultivo Murashige & Skoog (MS). B) Longitud del brote con medio de cultivo Woody Plant Medium (WPM), a los 60 días de evaluación.

6.3.3. Número de hojas

Los resultados de la formación de hojas en los explantes mostraron que el medio de cultivo empleado influyó significativamente ($F:7,76$ y $p\text{-valor}<0,0103$) (Anexo 17) en el número de hojas por tratamiento. El mayor número promedio de hojas se obtuvo con los tratamientos T4 (WPM – 2ip 2 mg L⁻¹) y T6 (testigo WPM), con un total de 14 hojas; mientras que los tratamientos T1 (MS – Kinetina 2 mg L⁻¹) y T5 (Testigo MS) presentaron el menor número promedio con 4 y 7 hojas respectivamente, tal y como se muestra en la figura 11.

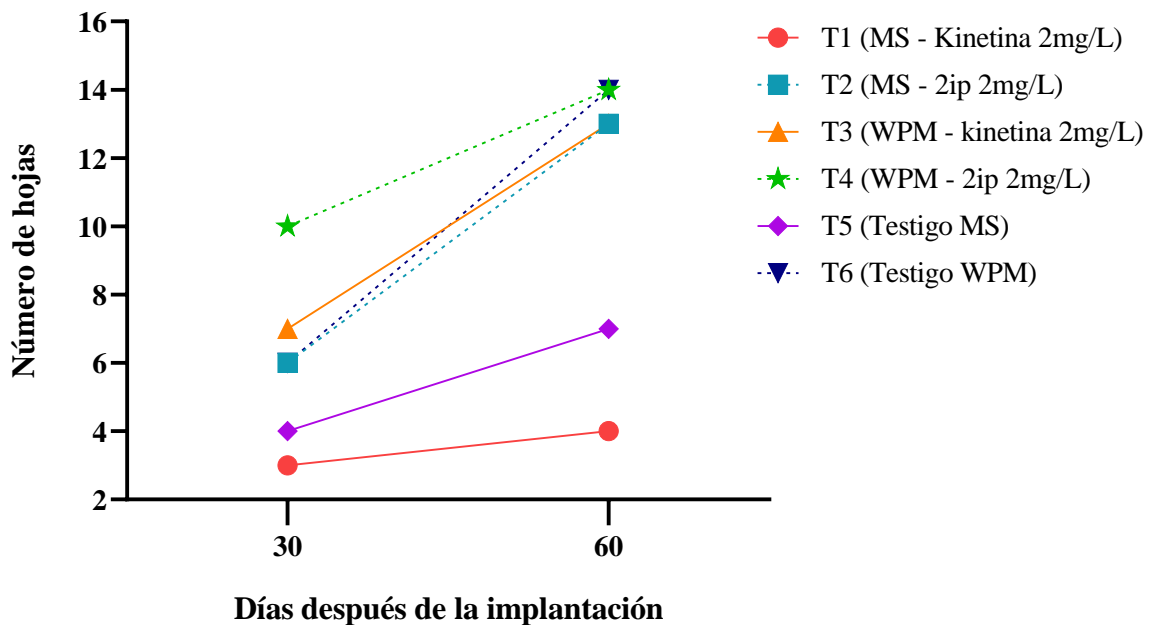


Figura 11. Número de hojas por brote en explantes de arándano por cada tratamiento a los 30 días de evaluación. Medias con letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

7. Discusión

Los resultados obtenidos en esta investigación para la variable de contaminación sugieren que los tratamientos con una mayor concentración de NaClO y un tiempo de exposición más corto son más efectivos para reducir la contaminación en explantes de arándano. Esto implica que el uso de concentraciones con mayor tiempo de inmersión no resultó tan efectivo como se podría esperar, ya que se observó un mayor porcentaje de explantes contaminados. Estos resultados son corroborados por trabajos como el de Matos y colaboradores (2006) quienes reportaron un 24% de contaminación al utilizar 15% de una solución de cloro comercial. Además, Hine & Abdelnour (2013) obtuvieron 92 % y 98 % de contaminación al utilizar 2% y 1,5 % de NaClO por 20 minutos, en comparación con el 20% de contaminación obtenido en este ensayo con concentraciones de 15 % durante 10 minutos, mientras que Cayo & Peralta (2021) lograron reducir la contaminación al 4% utilizando hipoclorito en concentración del 70% durante 10 minutos; estos resultados podrían indicar que al aumentar la concentración se reduce considerablemente la contaminación, sin embargo, es importante tener en cuenta que los autores no evaluaron la fenolización de los explantes, problema que sí se detectó en esta investigación al aumentar la concentración de NaClO, como se discutirá más adelante. Por otra parte, el grado de desinfección superficial obtenido también depende del tiempo de exposición de los tejidos al desinfectante, así como de la procedencia del material (Rathore *et al.*, 2007): Mroginski & Roca (2000) mencionan que a medida que los tejidos se exponen por más tiempo al desinfectante, se deterioran y se vuelven más susceptibles al ataque de patógenos tal y como ocurrió en esta investigación con el tiempo de inmersión más alto. Respecto a la procedencia, la edad fisiológica del tejido utilizado para iniciar el establecimiento es un factor clave en el proceso de desinfección, ya que el material obtenido de plantas en crecimiento es más fácil de desinfectar en comparación con el de plantas maduras, debido a que estas últimas tienden a tener mayores cantidades de ceras y ligninas, las cuales actúan como una barrera que dificulta la acción del agente desinfectante sobre los microorganismos endógenos (López *et al.*, 2010; Pedroza *et al.*, 2007), además este material maduro ha estado en contacto con el medio ambiente durante mucho tiempo y ha desarrollado relaciones patogénicas con otros organismos internamente, lo que dificulta la desinfección superficial (Abdelnour *et al.*, 2011), también es importante mencionar que varios investigadores han señalado la dificultad de trabajar con material proveniente de campo, incluso cuando a las plantas madre se les da un manejo fitosanitario previo a la colecta (George *et al.*,

2008). Aunque hubiera sido recomendable utilizar tejidos más jóvenes, la utilización de tejidos maduros en esta investigación se debió a la escasa disponibilidad de material vegetal.

La presencia de contaminación fúngica en los ensayos de desinfección realizados fue muy significativa y de acuerdo con Villegas (1990) y Razdan (2003) los hongos son microorganismos contaminantes frecuentes en los cultivos de tejidos, particularmente cuando se emplea tejido adulto de plantas provenientes del campo, como el utilizado en este experimento.

En cuanto a la fenolización, la manipulación de los explantes y el tiempo de exposición al desinfectante utilizado en los tratamientos favorecieron la oxidación. Estos resultados concuerdan con los de Guartanza (2019) quien obtuvo 100 % de explantes fenolizados al utilizar concentraciones de 75 % de NaClO durante 10 min en Cinchona. La fenolización es una variable importante que debe tenerse en cuenta al realizar un protocolo de desinfección, ya que, a mayor concentración de hipoclorito de sodio y en interacción con más tiempo de exposición para controlar la contaminación, podríamos favorecer la fenolización y necrosis de los explantes, variable que no evaluaron Cayo & Peralta (2021) cuando utilizaron hipoclorito al 70 %, tal y como se explicó anteriormente. Hernández & Gonzales (2010) manifiestan que el establecimiento del cultivo *in vitro* de tejidos de plantas leñosas, como la mayoría de las especies frutales, es común que los tejidos sufran oscurecimiento y necrosis; este fenómeno de oscurecimiento se produce debido a la actividad de enzimas como las polifenoloxidasas y tirosinasas que se sintetizan cuando los tejidos sufren daños, estas enzimas actúan sobre los polifenoles y la tirosina, oxidándolos y produciendo quinonas que son tóxicas para las plantas. Además, estas sustancias pueden polimerizarse, afectar las proteínas e inhibir el crecimiento y la viabilidad de los explantes. Afortunadamente en nuestro caso, la fenolización no afectó significativamente la viabilidad de los explantes, es decir el grado de oxidación no fue lo suficientemente fuerte como para causar la muerte del material vegetal. Sin embargo, es importante tenerla en cuenta para evitar problemas de viabilidad.

La mayor pérdida, al igual que ocurrió en la contaminación, se registró en los tratamientos con una mayor exposición al NaClO, estos resultados coinciden con los obtenidos por Campos *et al.* (2020) quienes al aplicar hipoclorito de sodio al 3 % durante 15 minutos en explantes de caoba, obtuvieron un 86% de explantes vivos, mientras que al incrementar el tiempo de exposición a 20 minutos la supervivencia se redujo al 46 %. Al analizar las pérdidas sufridas durante la fase de desinfección Rache & Pacheco (2010) afirman que los problemas de oscurecimiento y muerte en los explantes de *Vaccinium meridionale* tomados de plantas de

campo y cultivados *in vitro*, se deben en gran parte, a las drásticas condiciones de asepsia aplicadas para eliminar los contaminantes superficiales. Se ha demostrado que para reducir las pérdidas tanto por contaminación y fenolización es necesario encontrar un balance entre la concentración de NaClO y el tiempo de exposición.

Las investigaciones en micropropagación de arándano y otras bayas han demostrado que la adición de citoquininas al medio de cultivo se emplea para interrumpir la dominancia apical y promover la inducción y proliferación de yemas axilares, y generalmente se recomienda el uso de BAP, Kinetina, 2ip y Zeatina en varias concentraciones; no obstante, se ha observado que las concentraciones más bajas suelen ser más efectivas, ya que las concentraciones elevadas de reguladores de crecimiento favorecen la desdiferenciación y formación de callo (Jiménez y Abdelnour, 2017).

En relación a la variable porcentaje de brotación por explante, se encontró una diferencia notable entre las dos citoquininas utilizadas: el 2ip resultó superior a la kinetina en cuanto a su efectividad en la brotación de explantes de arándano. Es importante destacar que en todos los tratamientos se obtuvo un solo brote por explante, producto de la elongación de la yema axilar. Estos resultados coinciden con los de Cabrera & Guamán (2023); Georgieva & Kondakova (2021) que registraron una yema desarrollada por microestaca y un 55.5 % de brotación en la variedad Biloxi al utilizar 2ip a una concentración de 2.0 mg L⁻¹. Además, se observó que la brotación se igualó en todos los tratamientos; 7 días después del tiempo de evaluación estipulado de un mes, excepto en el T1 (MS + kinetina). Esto indica que, independientemente del tiempo transcurrido, todos los tratamientos alcanzaron un nivel similar de brotación, lo cual concuerda con Cruz (2020) quien reportó una respuesta menos favorable al utilizar kinetina con un menor porcentaje de brotación. Estos datos confirman que un mismo tejido reacciona de modo diferente ante el estímulo hormonal incluso cuando se trate de compuestos relacionados. Según Gutiérrez & Gonzales (2019) esto se debe a que el genotipo de la planta y los componentes del medio de cultivo están estrechamente relacionados con la respuesta de la planta a los reguladores de crecimiento; en el caso específico de esta investigación, se demostró que la Kinetina combinada con el medio de cultivo MS tuvo un efecto negativo significativo en el desarrollo y crecimiento de los brotes, lo que se reflejó en los peores promedios en todas las variables evaluadas. Esto sugiere que la interacción entre el genotipo de los arándanos y la Kinetina combinada con los componentes específicos del medio de cultivo MS, interfirieron en los procesos de división celular, elongación y diferenciación de tejidos. Así mismo, se debe tener en cuenta que las citoquininas naturales, como la zeatina a

diferencia de las sintéticas, como la kinetina son rápidamente degradadas por la citoquinina oxidasa de las plantas, promoviendo así la brotación de forma rápida (George, 2008). Por lo tanto, es esencial conocer las características del genotipo y del explante, para determinar las concentraciones más adecuadas y el tipo de citoquinina que debe usarse en cada caso (Ostrolucká *et al.*, 2004).

En cuanto al medio de cultivo más adecuado para el cultivo *in vitro* de arándano, se encontró que el medio de cultivo Woody Plant Medium (WPM) es el más efectivo para obtener tasas de longitud del brote y número de hojas óptimas. Estos resultados coinciden con los de Vílchez *et al.* (2014), que reportaron valores superiores en las variables NB (2.26), NN (3.22), CM (3.8) y LB (1.1 cm) al utilizar el medio de cultivo WPM en comparación con el MS. Otros estudios también han mostrado resultados similares con diferentes variedades de arándano (*Vaccinium myrtillus* L.) y otras especies leñosas como bayberry (*Myrica esculenta*) y Guayaba (*Psidium guajaba*) (Cüce & Sökmen, 2015; Bhatt & Dhar, 2004; Ocampo & Nuñez, 2007). La razón de esta diferencia se debe a la composición y concentración de sales en el medio de cultivo, que influyen directamente en la inducción de brotes. El WPM se caracteriza por tener una baja concentración de sales Mg^{+} (1.875 mM) y Cl (1,3 mM), lo que lo hace idóneo para plantas leñosas sensibles a la salinidad, como el arándano (Cardoza, 2008; Sedlak & Paprstein, 2009; Ružić *et al.* 2012). Por otro lado, el MS tiene una alta concentración de sales que disminuyen el potencial osmótico del medio y afecta la absorción de agua y nutrientes por parte del explante; dificultando su hidratación, crecimiento y multiplicación (Silva *et al.*, 2004). Por esta razón, aunque el MS es ampliamente utilizado para la propagación *in vitro* de varias especies de plantas, no es apto para la propagación *in vitro* de arándanos.

Este estudio reveló que el medio de cultivo WPM sin regulador de crecimiento fue el más efectivo para las variables longitud de brote y número de hojas, lo que coincide con los resultados obtenidos por Aquije (2020). Según Villalobos & Thorpe (2003), también el tipo y el estado del explante influyen en la respuesta a las citoquininas, ya que los explantes tienen diferentes niveles de hormonas endógenas que pueden generar un balance hormonal favorable o desfavorable para la formación y desarrollo de brotes; esto sugiere que la carga hormonal endógena del explante, junto con las características nutricionales del medio de cultivo permitieron la elongación de los brotes y el desarrollo de hojas. Esto implica que la fase de establecimiento o cultivo de yemas se puede realizar sin la necesidad de añadir hormonas al medio de cultivo, lo que permite prescindir de este gasto adicional y por lo tanto disminuir los costos de producción de plantas *in vitro* de arándano.

8. Conclusiones

- En la fase de desinfección de explantes de arándano provenientes de plantas de campo, se encontró que las concentraciones más altas de NaClO, junto con un menor tiempo de inmersión resultaron más eficientes para controlar la contaminación bacteriana y fúngica. Por lo tanto, los tratamientos que presentaron la menor contaminación de explantes, con un 20 %, fueron el T3 (15 % NaClO y 10 min) y T5 (20 % NaClO y 10 min).
- La oxidación fenólica de los explantes estuvo relacionada con la concentración de NaClO, sin que se observara un efecto significativo del tiempo de inmersión. De modo que los tratamientos T1 y T2 (10 % NaClO) presentaron la menor fenolización con un 40 %. Además, es importante mencionar que el grado de oxidación no influyó significativamente en la viabilidad de los explantes.
- El tratamiento que mostró los niveles más bajos de pérdida para la desinfección de los explantes fue el T3, que consistió en sumergir los explantes en una solución al 15 % de NaClO durante 10 minutos, con un 20 % de pérdida a los 30 días de la implantación. Este tratamiento mostró un balance óptimo entre concentración y tiempo de exposición, logrando eliminar la mayor parte de los agentes contaminantes sin afectar la viabilidad de los explantes.
- En la fase de crecimiento en la propagación *in vitro* de explantes de arándano variedad biloxi se determinó que el mejor tratamiento fue el T5 (Testigo WPM), obteniendo resultados superiores con un promedio de longitud de brote de 5.08 cm y un promedio de 14 hojas por explante. Demostrando que el uso del medio de cultivo WPM es una alternativa eficaz para la micropropagación de esta especie.
- Se pueden obtener brotes desarrollados de arándano sin adicionar hormonas, considerando que en este estudio se obtuvo el mejor resultado en el tratamiento testigo que estuvo constituido por medio de cultivo WPM, lo que sugiere que la carga hormonal del explante más el contenido del medio de cultivo fueron suficientes para el desarrollo del brote en la fase de establecimiento o cultivo de yemas.

9. Recomendaciones

- Llevar las plantas al invernadero y hacer controles fitosanitarios; con productos fungicidas y bactericidas al menos un mes antes. Además, como se ha realizado en este estudio es importante hacer una desinfección previa de las varetas en laboratorio a base de fungicida durante 3 horas. Esto permitirá reducir la carga microbiana y asegurará que el material esté libre de enfermedades; reduciendo la posibilidad de contaminación durante la implantación, lo cual es crucial para lograr un proceso de propagación *in vitro* exitoso.
- Para la desinfección probar concentraciones entre 15 y 20 % NaClO combinada con tiempos de inmersión inferiores a 10 minutos, debido a que este tratamiento presentó el menor porcentaje de pérdida con un 20 %. Esto permitirá establecer protocolos más eficientes que aseguren mayor supervivencia de los explantes.
- Para la fase de establecimiento y desarrollo de yemas, se recomienda trabajar con el medio WPM debido a los excelentes resultados obtenidos en esta investigación. Además, se sugiere no utilizar hormonas durante esta fase, ya que el testigo WPM sin regulador de crecimiento demostró obtener una mejor respuesta en cuanto a longitud de brote y número de hojas de los explantes.

10. Bibliografía

- Abdelnour, A., Aguilar, M. & Valverde, L. (2011). Micropropagación de pilón (*Hieronyma alchornoides*). Agronomía Costarricense 32(2): 9-19. ISSN:0377-9424 / 2011.
- Agrobit. (2022). El cultivo de arándano. Córdoba, Argentina. Recuperado el 20 de mayo de 2023 de [https://agrobit.com/Documentos/I_1_7_Cultivos/MI000002ar.htm#:~:text=Seg%C3%BAAn%20Fundaci%C3%B3n%20Chile%2C%20la%20propagaci%C3%B3n.propagaci%C3%B3n%20in%20vitro%20\(clonaci%C3%B3n\).](https://agrobit.com/Documentos/I_1_7_Cultivos/MI000002ar.htm#:~:text=Seg%C3%BAAn%20Fundaci%C3%B3n%20Chile%2C%20la%20propagaci%C3%B3n.propagaci%C3%B3n%20in%20vitro%20(clonaci%C3%B3n).)
- Aquije, J. (2020). Establecimiento *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum L.*) variedad Biloxi. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras. Recuperado el 25 de septiembre de 2023 de <https://bdigital.zamorano.edu/items/d3dcbd5f-4ca8-4e43-97ca-d9cec7adba3c>.
- Ostrolucká, M., Libiaková G, Ondrušková E, Gajdošová A (2004) *In vitro* propagation of *Vaccinium* species. Acta Universitatis Latviensis Biology 676: 207-212.
- Bhatt, I. y Dhar, U. (2004). Factors Controlling Micropropagation of *Myrica esculenta* buch. -Ham. ex D. Don: a High Value Wild Edible of Kumaun Himalaya. African Journal of Biotechnology, 3, 534-540. <https://doi.org/10.5897/AJB2004.000-2097>.
- Baldomero N., Alavez Y., Domínguez V. (2017). Manejo agronómico del cultivo de arándano (*Vaccinium corymbosum L.*) en la sierra norte de Oaxaca. Universidad Tecnológica de la Sierra Sur de Oaxaca. Recuperado el 20 de mayo de 2023 de <https://dokumen.tips/documents/manejo-agronmico-del-cultivo-de-arndano-azul-o-azul-oscuro-cuya-fase-se.html?page=1>.
- Bhatt, I., Dhar, U. (2004). Factors controlling micropropagation of *Myrica esculenta* buch. “ Ham. ex D. Don: a high value wild edible of Kumaun Himalaya. African Journal of Biotechnology , 3(10), 534-540. <https://doi.org/10.5897/AJB2004.000-2097>.
- Bisho, T., Rawat, L., Chakraborty, B., y Yadav, V. (2018). A Recent Advances in Use of Plant Growth Regulators (PGRs) in Fruit. Revista Internacional de Microbiología Actual y Ciencias Aplicadas, 7 (5), 2319 – 7706.

- Cabrera, R., Guamán, D. (2023). Efecto de diferentes concentraciones de 6-Bencilaminopurina (BAP) y 2- isoPentil adenina (2iP) en la multiplicación *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* L (arándano) cvs. Biloxi y Emerald. Universidad de Cuenca. Azuay, Ecuador. Recuperado el 25 de septiembre de 2023 de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/42373/1/Trabajo-de-Titulaci%C3%B3n.pdf>.
- Campos, J., Arteaga, M., Campos, S. (2020). Establecimiento de un protocolo de desinfección y micropropagación *in vitro* de “caoba” *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae). *Arnaldoa* 27 (1):141-156. Recuperado el 24 de junio de 2023, de <http://doi.org/10.22497/arnaldoa.271.27107>.
- Capó, Y., Cruz, M., Portal, N., Acosta, M., y Leiva, M. (2004). Influencia de las concentraciones de sales MS y sacarosa del medio de cultivo para las plantas *in vitro* sobre el crecimiento de contaminantes bacterianos de la micropropagación de la caña de azúcar. *Bioteología Vegetal*, 4 (3), 139 – 142.
- Cardoza, V. (2008) Tissue culture: The manipulation of plant development. En: Stewart, CN, Wiley J (Ed). *Plant biotechnology and genetic: principles, techniques, and applications*, pp. 113-134. Inc. Knoxville, Tennessee.
- Carranza, M., Reyes, W., Mora, O., Cevallos, A., Escobar, M., Cadme, J., Nieto & J. Morante. (2013). Propagación clonal *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (CAOBA). *Ciencia y Tecnología* 6(2): 1-8. DOI: 10.13140/RG.2.1.4635.8489.
- Cayo, N., Peralta, E. (2021). Propagación *in vitro* del cultivo de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) en el cantón Cevallos provincia Tungurahua. Tesis previa a la obtención del título de ingeniero agrónomo. Universidad Técnica de Cotopaxi. La Maná, Ecuador.
- Cruz, Y. (2020). Efecto de citoquininas en el cultivo *in vitro* de dos especies de berries nativos del Perú: *Vaccinium floribundum* Kunth «pushgay» Y *Macleania rupestris* Kunth A.C. Smith. Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima, Perú.
- García, J., García, G., Ciordia, M. (2018). El cultivo del arándano en el norte de España. 1ª ed. Asturias: SERIDA. Recuperado el 24 de junio de 2023, de <http://www.serida.org/pdfs/7452.pdf>.
- George, E., Hall, M.A. & De Klerk, G. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture*. Vol. 1. 3 ed. Springer. pp. 2-3, 205-219.

- Gómez, G., Urbina, E., Villegas, T. (2010). Establecimiento de protocolos para la propagación *in vitro* de plantas. *Polibotánica*, (30), 89-110. Recuperado el 24 de junio de 2023, de https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682010000200007.
- Guartanza, J. (2019). Procesos biotecnológicos para la implantación e inducción de callos en *Cinchona officinalis* L., a partir de plántulas del invernadero, a nivel de laboratorio en la provincia de Loja. Tesis previa a la obtención del título de ingeniera forestal. Universidad Nacional de Loja. Loja, Ecuador.
- Gutierrez, A., Gonzales, P. (2019). Reguladores de crecimiento en el cultivo *in vitro* de tres cultivares portainjertos de vid (*Vitis vinifera* L.) para su uso en la industria del pisco. *Scientia Agropecuaria*, 10(4), 461-468. <https://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.04.02>
- Hernández Y. Gonzales M. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. *Cultivos Tropicales*, 31(4), 00. Recuperado el 30 de julio de 2023, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362010000400015&lng=es&tlng=es.
- Hine, A., y Abdelnour, A. (2013). Establecimiento *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* L). Tecnología en Marcha. Vol.26, N°4. Pág 64-71 <https://doi.org/10.18845/tm.v26i4.1584>.
- Hussain, A., Ahmed, I., Nazir, H., & Ullah, I. (2012). Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. InTech. doi: 10.5772/50568. Recuperado el 20 de mayo de 2023 de <https://www.intechopen.com/chapters/40180>.
- Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. (2016). Micropropagación de especies hortícolas. INIA. Recuperado el 20 de mayo de 2023 de http://www.inia.uy/Documentos/P%C3%BAblicos/INIA%20Salto%20Grande/2016/2016_05_04_Biotecnologia/07_Biotecnologia_Mario%20Giambiasi.pdf.
- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (2011). Guía práctica para el cultivo de Arándanos. INTA. Recuperado el 20 de mayo de 2023 de https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-mg_0801.pdf.

- Instituto para la Innovación Tecnológica en la Agricultura (2017). El Cultivo de Arándano. Recuperado el 20 de mayo de 2023 de <https://www.intagri.com/articulos/frutillas/El-Cultivo-deAr%C3%A1ndano-o-Blueberry>.
- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (2022). Desarrollo de protocolos de micropropagación. INTA. Recuperado el 20 de mayo de 2023 de <https://inta.gob.ar/servicios/desarrollo-de-protocolos-de-micropropagacion>.
- Jiménez, V., y Abdelnour, A. (2017). Protocolo de micropropagación de arándano nativo de Costa Rica (*Vaccinium consanguineum*). Tecnología en marcha, 31 (1), 144-159.
- Kyte, L., Klein, J. (1996). Plants from test tubes: an introduction to micropropagation. 3 ed. Portland, Oregon, US, Timber Press. Agricultural Sciences, Vol.2 (3).
- Laguna, Y., Cueva, J., Tamariz, C. y Olivera, P. (2019). Efecto de los reguladores de crecimiento vegetal en la multiplicación y enraizamiento *in vitro* de senecio calvus (*asteraceae*), planta medicinal altoandina, endémica del Perú. Altoandinas, 21 (2), 111 -121.
- Lerma, S., García, D., Fandiño, W., Escobar, W. (2019). Propagación *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum L.*) a partir de yemas axilares. Revista Siembra CBA, (2), 9–19.
- López-Gómez, P., Iracheta-Donjuan, L., Castellanos-Juárez, M., Méndez-López, I., Sandoval-Esquivel, A., Aguirre-Medina, J. F., ... & Gutiérrez-Díez, A. (2010). Influencia del explante y medio de cultivo en la embriogénesis somática en hojas de café. Revista fitotecnia mexicana, 33(3), 205-213.
- Matos, A., J. Molina y D. Acosta. (2000). Establecimiento de una metodología eficiente para el cultivo *in vitro* de *Aloe vera* L. Ciencia 8(3):280-284.
- McCown, B., Lloyd, G. (1981) Woody Plant Medium (WPM)—A Mineral Nutrient Formulation for Microculture of Woody Plant Species. HortScience, 16, 453-453.
- Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego. (2019). Producción de arándanos en Perú crece 796% más que hace cuatro años. Recuperado el 20 de mayo de 2023 de <https://gestion.pe/economia/arandanos-produccion-minagri-produccion-de-arandanos-en-peru-crece-796-mas-que-hace-cuatro-anos-pero-su-precio-en-chacra-cae-noticia/>.

- Ministerio de Agricultura y Ganadería (2022). Ecuador entra a competir en el mercado internacional de arándanos. Recuperado el 20 de mayo de 2023 de <https://www.agricultura.gob.ec/ecuador-entra-a-competir-en-el-mercado-internacional-de-arandanos/#:~:text=internacional%20de%20ar%C3%A1ndanos-.Ecuador%20entra%20a%20competir%20en%20el%20mercado%20internacional%20de%20ar%C3%A1ndanos,puede%20exportar%20a%2035%20pa%C3%A1ses.>
- Mroginsky, L. & Roca, W. (2000). Establecimiento de cultivos de tejidos Vegetales *in vitro*. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. http://www.ciat.cgiar.org/biotechnology/cultivo_tejidos/capitulo2.pdf.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium of rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* vol. 15, p. 473- 497.
- Ñacato, P. (2018). El arándano, un fruto de reciente producción en el país. Recuperado el 20 de mayo de 2023 de <https://www.revistalideres.ec/lideres/arandano-fruto-reciente-produccion-ecuador.html>.
- Ortiz, M. (2022). La producción mundial de arándanos alcanzaría las 935.500 toneladas este año. Recuperado el 20 de mayo de 2023 de <https://www.redagricola.com/pe/la-produccion-mundial-de-arandanos-alcanzaria-las-935-500-toneladas-este-ano/>.
- Ocampo, F. y Núñez C. (2007). Propagación *in vitro* de *Psidium guajaba* mediante organogénesis directa a partir de segmentos nodales. *Ciencia Y Tecnología Agropecuaria*, 8(1), 22–27. https://doi.org/10.21930/rcta.vol8_num1_art:79.
- Ovando, I. (2012). Manual de Cultivo de Tejidos Vegetales para Ingenieros Biotecnólogos. Recuperado el 20 de mayo de 2023 de https://www.academia.edu/14901719/cultivo_de_tejidos_vegetales.
- Pedroza, J. A., González, S. R., & Téllez, D. C. (2007). Micropropagación de *Dodonea viscosa* (L) Jacq: una especie en vías de extinción. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 9(2), 33-44.
- Prieto, H., Jordan, M., Cordeiro, M., Durzan, D., y Cid, L. (2005) *Biotecnología Vegetal*. Recuperado el 20 de mayo de 2023 de

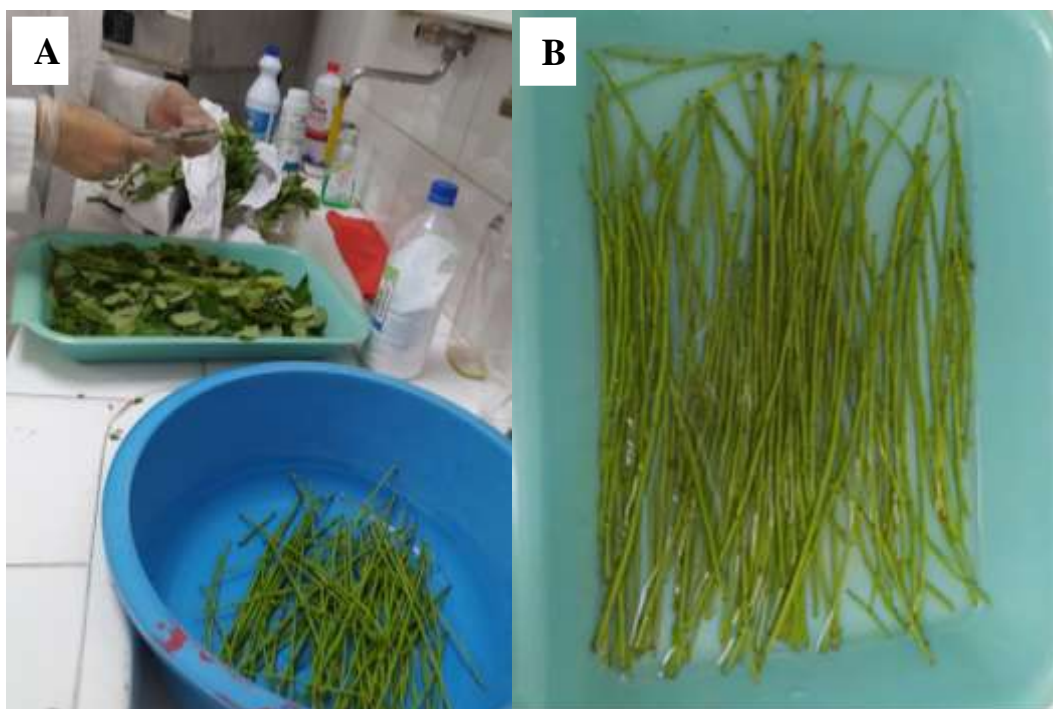
https://www.researchgate.net/publication/264551854_Biotecnologia_Vegetal_texto_basico_biotecnologia_en_espanol.

- Rache, L., Pacheco, C. (2010). Propagación *in vitro* de plantas adultas de *Vaccinium meridionale* (Ericaceae). Acta Botánica Brasilica. Recuperado el 25 de julio de 2023 de <https://doi.org/10.1590/S0102-33062010000400024>.
- Razdan, M.K. (2003). Introduction to plant tissue culture. 2 ed. Indiana, US: Science Publishers. Pp. 35-40.
- Rathore, J. S, M. S. Rathore; M. Singh, R. P. Singh & N. S. Shekhawat. (2007). Micropopagation of mature tree of Citrus limon. Indian Journal of Biotechnology, 6, 239-244.
- Rodríguez, C., y Zhurbenko R. (2018). Manual de medios de cultivo. Recuperado el 20 de mayo de 2023 de <https://www.biocen.cu/wp-content/uploads/2021/05/Manual-MC-2018.pdf>.
- Ruzić, D., Vujović, T., Cerović, R., Ostrolucka, M., Gajdosova, A. (2012). Micropropagation *in vitro* of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). [10.17660/ActaHortic.2012.926.36](https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.926.36).
- Salgado, C., Sánchez, P., Volke, V., y Colinas, María. (2018). Respuesta agronómica de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) al estrés osmótico. Agrocienca, 52 (2), 231-239.
- Sedlak, J. and Paprstein, F. (2009). *In vitro* multiplication of highbush blueberry (*vaccinium corymbosum* l.) cultivars. Acta Hortic. 810, 575-580. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.810.76>.
- Sharry, S., Adema, M., y Abedini, W. (2015). Plantas de probeta. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. Recuperado el 20 de mayo de 2023 de <file:///C:/Users/Lenovo/Desktop/ARANDANO%20-%20Micropropag/LIBROS%20REFERENCIALES/LIBROS%20CULTIVO%20IN%20VITRO/plantas%20de%20probeta.pdf>.
- Silva M., Villegas, M., García, G., González, M., Mendoza, R., Posadas, M. (2004) Efecto del potencial osmótico y contenido de Ca en el medio de cultivo sobre la distribución de Ca²⁺ y K⁺, producción de biomasa y necrosis apical de vid "R110". *Interciencia* 29:384-388. Recuperado el 30 de septiembre de 2023 de

http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442004000700009&lng=es&tlng=es.

- Suarez, I. (2020). Cultivo de tejidos vegetales. Fondo Editorial. Recuperado el 20 de mayo de 2023 de <file:///C:/Users/Lenovo/Desktop/ARANDANO%20-%20Micropropag/LIBROS%20REFERENCIALES/LIBROS%20CULTIVO%20IN%20VITRO/Cultivo%20de%20Tejidos%20Vegetales%20Edici%C3%B3n%2003-03-2020.pdf>.
- Thomas, CM. (1979). Biochemistry and physiology of plant hormones. Berlín, Springer - Verlag. 274 p.
- U.S. Department of Agriculture (2021). Blueberries Around the Globe – Past, Present, and Future. Recuperado el 20 de mayo de 2023 de https://www.fas.usda.gov/sites/default/files/2021-10/GlobalBlueberriesFinal_1.pdf.
- U.S. Department of Agriculture (2023). Blueberry Annual Voluntary 2023. Recuperado el 6 de noviembre de 2023 de https://chilealimentos.com/wp-content/uploads/2023/05/Blueberry-Annual-Voluntary-2023_Beijing-ATO_China-Peoples-Republic-of_CH2023-0046.pdf.
- Vilchez, J., Martínez, L., Álvarez, C., Albornoz, A., Albany, N., Molina, M., Garcia, L. (2014). Medio de cultivo y reguladores de crecimiento en la multiplicación *in vitro* *Psidium guajava* L. Biotecnología Vegetal Vol. 14, No. 1: 15 – 20.
- Villegas, A. (1990). Métodos asépticos. Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. FAO 105, 21 p.
- Villalobos, V., Thorpe, T. (2003). Micropropagación Conceptos y Resultados. Unidad de Recursos Fitogenéticos, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica. Recuperado el 6 de noviembre de 2023 de <https://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Cultivo%20de%20Tejidos%20en%20la%20Agricultura/capitulo6.pdf>

11. Anexos



Anexo 1. Preparación del material vegetal: A) deshoje de las varetas y B) desinfección con fungicida (Azoxystrobin + flutriafol).



Anexo 2. Preparación de tratamientos con hipoclorito de sodio (10%,15% y 20%) para exposición de los explantes según los tiempos de inmersión (10 y 15 min).



Anexo 3. Implantación de los explantes de arándano en los tubos de ensayo con medio de cultivo base (Murashige y Skoog) dentro la cámara de flujo laminar

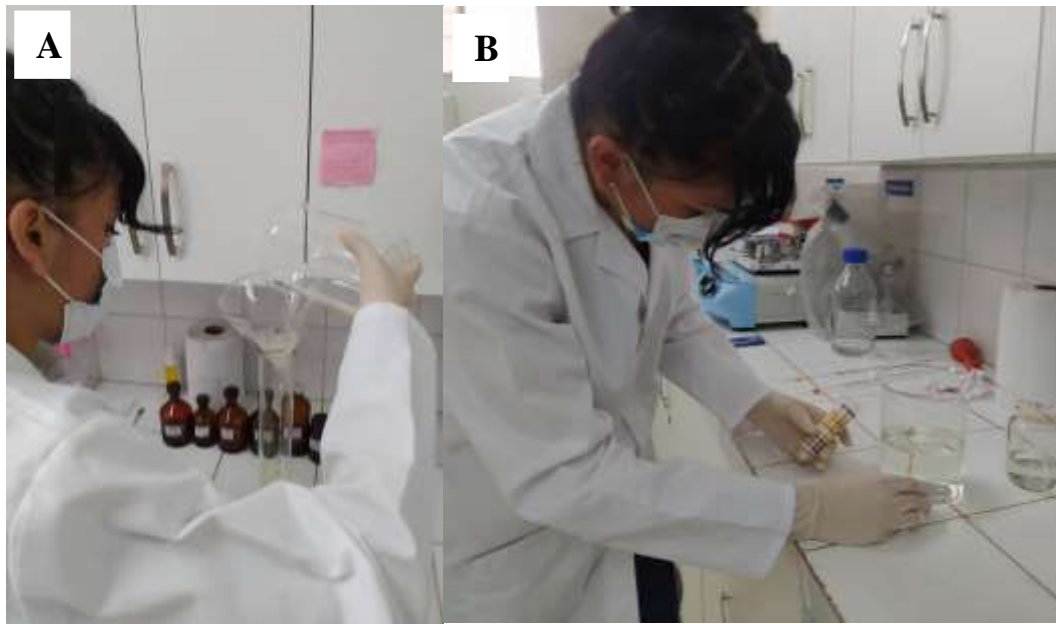


Anexo 4. Brotes de explantes de arándano a los 30 días del establecimiento en cuarto de incubación

Anexo 5. Datos obtenidos para el protocolo de desinfección, bajo la aplicación de distintas concentraciones de hipoclorito de sodio y tiempos de inmersión para la propagación *in vitro* de arándano a los 30 días de evaluación.

Tratamientos	Repeticiones	Contaminación (%)	Fenolización (%)	Tasa total de pérdida (%)
T1	R1	0	25	0
T1	R2	50	50	50
T1	R3	50	25	50
T1	R4	0	50	0
T1	R5	25	50	50
T2	R1	0	50	0
T2	R2	50	75	50
T2	R3	50	25	50
T2	R4	25	50	25
T2	R5	25	0	25
T3	R1	0	50	0
T3	R2	50	50	50
T3	R3	0	25	0
T3	R4	25	50	25
T3	R5	25	50	25
T4	R1	50	50	50
T4	R2	25	0	25
T4	R3	25	50	50
T4	R4	25	50	50
T4	R5	25	75	25
T5	R1	0	75	0
T5	R2	25	50	50
T5	R3	0	75	50
T5	R4	25	75	25
T5	R5	50	75	50
T6	R1	0	100	50
T6	R2	25	50	50
T6	R3	50	75	50
T6	R4	50	75	50
T6	R5	25	75	25

Leyenda: T= Tratamiento. T1= 10% NaClO + 10 min. T2 = 10% NaClO + 15 min. T3 = 15% NaClO + 10 min. T4 = 15% NaClO + 15 min. T5 = 20% NaClO + 10 min. T6 = 20% NaClO + 15 min.



Anexo 6. Preparación de medio de cultivo: A) Adición de sacarosa, B) control de pH.



Anexo 7. Tratamientos: A) T2 (MS - 2ip), B) T4 (WPM - 2ip), C) T5 (testigo MS), D) (Testigo WPM) a los 60 días de la implantación.

Anexo 8. Composición del medio base Murashige y Skoog (año 1962).

COMPONENTES		Concentración de la solución madre	g/L
fórmula	nombre	g/L	20X Concentración
Sales minerales			
Macronutrientes			
NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	1.65	33
KNO ₃	Nitrato de potasio	1.9	38
CaCl ₂ 2H ₂ O	Cloruro de calcio	0.44	8.8
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio	0.17	3.4
MgSO ₄ 7H ₂ O	Sulfato de magnesio	0.37	7.4
			100X Concentración
Micronutrientes			
	nombre		
KI	Ioduro de potasio	0.00083	0.083
H ₃ BO ₃	Acido bórico	0.0062	0.62
MnSO ₄ 4H ₂ O	Sulfato de manganeso	0,0223	2.23
ZnSO ₄ 7H ₂ O	Sulfato de zinc	0.0086	0.86
CuSO ₄ 5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado	0.000025	0.0025
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	Molibdato de sodio	0.00025	0.025
COCl ₂ 6H ₂ O	Cloruro de cobalto	0.000025	0.025
	nombre		50X Concentración
FeEDTA		0.037	1.85
FeSo ₄ 7H ₂ O	Sulfato de Hierro	0.027	
Na ₂ EDTA 2H ₂ O		0.0374	
	nombre		100X Concentración
Vitaminas			
	Tiamina	0.0001	0.01
	Piridoxina – hcl 0.5	0.0005	0.05
	ácido nicotínico	0.0005	0.05
	Mio- Inositol	0.1	10

Fuente: (Genplant, 2020)

Anexo 9. Composición del medio Woody Plant Medium (WPM)

COMPONENTES		Concentración de la solución madre	g/L
fórmula	nombre	g/L	50X Concentración
Sales minerales			
Macronutrientes			
NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	0.4	20
Ca (NO ₃ 4H ₂ O)	Nitrato de calcio	0.556	27.8
K ₂ SO ₄	Sulfato de potasio	0.99	49.5
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio	0.17	8.5
Ca Cl ₂ 2H ₂ O	Cloruro de calcio	0.096	4.8
MgSO ₄ 7H ₂ O	Sulfato de magnesio	0.37	18.5
			100X Concentración
Micronutrientes			
	nombre		
H ₃ BO ₃	Acido bórico	0.0062	0.62
MnSO ₄ 4H ₂ O	Sulfato de manganeso	0,0223	2.23
ZnSO ₄ 7H ₂ O	Sulfato de zinc	0.0086	0.86
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	Molibdato de sodio	0.000025	0.0025
CuSo ₄ 5H ₂ O	Sufato de cobre	0.00025	0.025
	nombre		50X Concentración
FeEDTA		0.037	1.85
FeSo ₄ 7H ₂ O	Sulfato de Fierro	0.027	
Na ₂ EDTA 2H ₂ O		0.0374	
	nombre		100X Concentración
Vitaminas			
	Tiamina	0.0001	0.01
	Piridoxina – hcl 0.5	0.0005	0.05
	ácido nicotínico	0.0005	0.05
	Mio- Inositol	0.1	10

Fuente: (Genplant, 2020)

Anexo 10. Datos obtenidos para evaluar dos fórmulas de medio de cultivo y la interacción hormonal para la propagación *in vitro* de arándano a los 30 y 60 días (B, LB, NH).

Tratamientos	Repeticiones	Brotación (%)	Longitud de brote (cm)	Número de hojas
T1	R1	0.00	0.00	0
T1	R2	0.25	1.00	5
T1	R3	0.00	0.00	0
T1	R4	1.00	1.10	7
T1	R5	0.25	1.00	6
T2	R1	0.50	2.50	9
T2	R2	0.25	3.20	18
T2	R3	1.00	2.00	12
T2	R4	1.00	1.50	9
T2	R5	1.00	1.70	16
T3	R1	1.00	8.50	22
T3	R2	0.25	1.20	7
T3	R3	0.50	3.35	19
T3	R4	0.50	1.20	7
T3	R5	0.50	2.20	7
T4	R1	0.25	4.50	17
T4	R2	1.00	3.50	13
T4	R3	0.75	3.90	16
T4	R4	0.75	2.25	15
T4	R5	1.00	1.95	10
T5	R1	1.00	1.66	9
T5	R2	0.00	2.10	0
T5	R3	1.00	1.50	9
T5	R4	1.00	3.25	11
T5	R5	1.00	1.00	4
T6	R1	1.00	0.00	0
T6	R2	1.00	10.00	22
T6	R3	0.50	5.20	10
T6	R4	0.50	5.70	20
T6	R5	0.00	4.50	16

Leyenda: T= Tratamiento. T1= MS + Kinetina 2mg L⁻¹. T2 = MS + 2ip 2mg L⁻¹. T3 = WPM + Kinetina 2mg L⁻¹. T4 = WPM + 2ip 2mg L⁻¹. T5 = Testigo (MS sin regulador). T6 = Testigo (WPM sin regulador).

Anexo 11. Análisis de laboratorio de las muestras de cultivo *in vitro* de arándano.



unl

Universidad
Nacional
de Loja

Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables.
Laboratorio de Sanidad Vegetal, Fitopatología y Microbiología
Agrícola.

RESULTADO DE ANÁLISIS

Muestra:	Cultivo in vitro de Arándano
Procedencia:	Laboratorio de Micropropagación
Director de tesis:	Ing. Jhonny Fernando Granja Travez
Usuario/a:	Lady Cueva
Carrera:	Agronomía
Ciclo:	9º

Resultado Hongos



Presencia hifas de hongos no fitopatógenos.

Resultado Bacterias



Presencia de Bacterias no fitopatógenas. Bacterias Gram+, Tiempo de generación 24 horas. Negativo para medio Agar MacConkey.

Ing. Jeamel Ruiz Toledo
Analista de Laboratorio

Loja, 14 de julio de 2023.

Anexo 12. Resultados del análisis estadístico ANOVA de la variable porcentaje de contaminación.

Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	232,79	5	46,56	37,26	0,0001
CONCENTRACIÓN	0,40	1	0,40	0,32	0,5779
TIEMPO	149,37	2	74,69	59,78	0,0001
TIEMPO*CONCENTRACIÓN	83,02	2	41,51	33,22	0,0001
Error	29,99	24	1,25		
Total	262,78	29			
Test: Tukey Alfa: 0.05 DMS: 20907					
TIEMPO CONCENTRACIÓN	Medias	n	E.E.		
15 minutos y 20 %	10,00	5	0,50	A	
10 minutos y 20 %	15,00	5	0,50	B	
10 minutos y 10 %	10,00	5	0,50	BC	
15 minutos y 15 %	15,00	5	0,50	CD	
10 minutos y 15 %	5,00	5	0,50	DE	
15 minutos y 10 %	5,00	5	0,50	E	
Medias con letras comunes no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)					

Anexo 13. Resultados del análisis estadístico ANOVA de la variable porcentaje de fenolización.

Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,64	5	0,13	3,98	0,0101
CONCENTRACIÓN	0,53	2	0,27	8,28	0,0021
TIEMPO	0,08	1	74,51	2,55	0,1242
TIEMPO*CONCENTRACIÓN	2, 6E - 04	2	1,3E-04	4,0E-03	0,9960
Error	0,71	22	0,03		
Total	1,35	27			
Test: Tukey Alfa: 0.05 DMS: 20907					
CONCENTRACIÓN	Medias	n	E.E.		
20 %	0,44	10	0,06	A	
15 %	0,50	9	0,06	B	
10 %	0,73	9	0,06	B	
Medias con letras comunes no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)					

Anexo 14. Resultados de la prueba de hipótesis marginales de la variable tasa total de pérdida.

Prueba de hipótesis marginales (SC tipo III)				
	numDF	F - valor	p-valor	
(Intercept)	1	18135,55	< 0,0001	
TIEMPO	1	36,56	< 0,0001	
CONCENTRACIÓN	2	286,62	< 0,0001	
TIEMPO: CONCENTRACIÓN	2	18,68	< 0,0001	
Prueba de hipótesis secuenciales				
	numDF	F - valor	p-valor	
(Intercept)	1	25238,94	< 0,0001	
TIEMPO	1	7,96	< 0,0094	
CONCENTRACIÓN	2	286,62	< 0,0001	
TIEMPO: CONCENTRACIÓN	2	18,68	< 0,0001	
Test: Tukey Alfa: 0.05 DMS: 20907				
TIEMPO CONCENTRACIÓN	Medias	N	E.E.	
15 minutos 20 %	0,45	5	0,01	A
10 minutos 20 %	0,35	5	0,01	B
15 minutos 15 %	0,40	5	0,01	C
10 minutos 10 %	0,30	5	3,2E-03	D
10 minutos 15 %	0,20	5	0,01	D
15 minutos 10 %	0,30	5	3,2E-03	D
Medias con letras comunes no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)				

Anexo 15. Resultados del análisis estadístico ANOVA de la variable número de brotes.

Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,42	5	0,08	21,89	0,0001
MEDIO DE CULTIVO	0,01	1	0,01	2,00	0,1705
HORMONA	0,17	2	0,08	21,71	0,0001
MEDIO DE CULTIVO*HORMONA	0,27	2	0,14	35,89	0,0001
Error	0,09	23	3,8		
Total	0,51	28			
Test: Tukey Alfa: 0.05 DMS: 0.76755					
TIEMPO CONCENTRACIÓN	Medias	n	E.E.		
Murashige y Skoog	0,80	5	0,03	A	
Woody Plant médium y 2ip (2 mg L ⁻¹)	0,75	5	0,03	A B	
Woody Plant médium y kinetina (2 mg L ⁻¹)	0,75	5	0,03	B	
Murashige y Skoog y 2ip (2 mg L ⁻¹)	0,60	5	0,03	B	
Woody Plant médium	0,55	5	0,03	B	
Murashige y Skoog y Kinetina (2 mg L ⁻¹)	0,38	4	0,03	C	
Medias con letras comunes no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)					

Anexo 16. Resultados del análisis estadístico ANOVA de la variable longitud de brote.

Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,42	5	0,08	21,89	0,0001
MEDIO DE CULTIVO	0,01	1	0,01	2,00	0,1705
HORMONA	0,17	2	0,08	21,71	0,0001
MEDIO DE CULTIVO*HORMONA	0,27	2	0,14	35,89	0,0001
Error	0,09	23	3,8		
Total	0,51	28			
Test: Tukey Alfa: 0.05 DMS: 0.76755					
TIEMPO CONCENTRACIÓN	Medias	n	E.E.		
Murashige y Skoog	0,80	5	0,03	A	
Woody Plant médium y 2ip (2 mg L ⁻¹)	0,75	5	0,03	A B	
Woody Plant médium y kinetina (2 mg L ⁻¹)	0,75	5	0,03	B	
Murashige y Skoog y 2ip (2 mg L ⁻¹)	0,60	5	0,03	B	
Woody Plant médium	0,55	5	0,03	B	
Murashige y Skoog y Kinetina (2 mg L ⁻¹)	0,38	4	0,03	C	
Medias con letras comunes no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)					

Anexo 17. Resultados del análisis estadístico ANOVA de la variable número de hojas.

Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	28,78	5	5,76	42,13	0,0001
MEDIO DE CULTIVO	14,18	1	14,18	103,78	0,0001
HORMONA	12,42	2	6,21	45,45	0,0001
MEDIO DE CULTIVO*HORMONA	5,17	2	2,58	18,91	0,0001
Error	3,01	22	0,14		
Total	31,78	27			
Test: Tukey Alfa: 0.05 DMS: 0.76755					
TIEMPO CONCENTRACIÓN	Medias	n	E.E.		
Woody Plant Medium	5,08	3	0,21	A	
Woody Plant médium y kinetina (2 mg L ⁻¹)	3,29	5	0,17	B	
Murashige y Skoog	3,22	5	0,17	B	
Woody Plant médium y 2ip (2 mg L ⁻¹)	2,18	5	0,17	B	
Murashige y Skoog y 2ip (2 mg L ⁻¹)	1,90	5	0,17	B	
Murashige y Skoog y Kinetina (2 mg L ⁻¹)	0,62	5	0,17	C	
Medias con letras comunes no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)					

Anexo 18. Certificado de traducción del resumen.

CERTIFICADO DEL RESUMEN

Yo, **Maholy Katherine Morocho Merino**, portadora de la cedula de Identidad N°:1104677131. Licenciada en Ciencias de la Educación Especialidad Idioma Inglés. Certifico la traducción al idioma inglés el resumen del Trabajo de Integración Curricular denominada: "**Protocolo para la propagación in vitro de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) cv. Biloxi**", perteneciente a la señorita **Leidy Stefania Cueva Ramos**, esta corresponde al texto original en español.

A la parte interesada muy atentamente,



Maholy Katherine Morocho Merino

Licenciada en Ciencias de la Educación Especialidad Idioma Inglés
Registro N° 1008-2016-1695982 SENEYCIT.