

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Ingeniería Agronómica

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

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo


Autor:

Rosa Angelica Cabrera Castro

Daisy Verónica Guamán Guamanrrigra

Director:

Segundo Moisés Maita Supliguicha

ORCID:  000-0003-2716-6978

Cuenca, Ecuador

2023-07-04

Resumen

El consumo y la demanda del fruto del arándano (*Vaccinium corymbosum* L) durante los últimos años ha incrementado a nivel mundial. Ecuador presenta condiciones climáticas favorables para el desarrollo de este cultivo. La propagación de la planta se realiza por esquejes o semillas, esta técnica es lenta e ineficiente, razones por lo que se busca una técnica alternativa, siendo esta el cultivo de tejidos *in vitro*. El proyecto tiene como objetivo evaluar el 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. Se realizó la evaluación de dos protocolos de desinfección con hipoclorito de sodio al 3% y 5%. Posteriormente se realizaron dos experimentos independientes uno para cada cultivar, con un diseño completamente al azar (DCA), con 6 tratamientos y 1 testigo con los biorreguladores BAP y 2iP en tres diferentes concentraciones 0,5%, 1,0% y 2,0%, se analizaron las variables: número de brotes, longitud de brotes y número de hojas. Se obtuvo como resultado que el hipoclorito de sodio (5%) durante 5 minutos presento menor contaminación de los explantes, por otra parte, las diferentes concentraciones de los biorreguladores utilizados no promovieron la multiplicación de brotes, pero indujeron crecimiento y desarrollo de la yema. El 2iP a una concentración de 0.5% presento mayor número de explantes desarrollados y número de hojas en los dos cultivares y presento una mayor longitud de yema solo en el cv. Biloxi.

Palabras clave: frutos, cultivos, propagación, plantas, crecimiento



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Abstract

The consumption and demand of the blueberry fruit (*Vaccinium corymbosum* L) during the last years has increased worldwide, Ecuador presents favorable climatic conditions for the development of this crop. The propagation of the plant is done by cutting or seeds, this technique is slow and inefficient, reasons why an alternative technique is sought, this being the culture of tissues *in vitro*. The project aims to evaluate the effect of different concentrations of 6-Benzylaminopurine (BAP) and 2-isoPentyl adenine (2iP) on the *in vitro* multiplication of *Vaccinium corymbosum* L (blueberry) cvs. Biloxi and Emerald. Two disinfection protocols with sodium hypochlorite at 3% and 5% were evaluated. Subsequently, two independent experiments were carried out, one for each cultivar, with a completely randomized design (DCA), with 6 treatments and 1 witness with the bioregulators BAP and 2iP in three different doses 0,5%, 1,0% and 2,0% the variables were analyzed: number of shoots, length of shoots and number of leaves. It was obtained as a result that sodium hypochlorite (5%) for 5 minutes presented less contamination of the explants, on the other hand, the different doses of the bioregulators used did not promote the multiplication of shoots, but if induced in the growth and development of the yolk. The 2iP at a concentration of 0.5% presented a greater number of explants developed and number of leaves in the two cultivars and presented a longer length of yolk only in cv. Biloxi.

Keywords: fruits, crops, propagation, plants, growth



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

Institutional Repository: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Índice de contenido

Introducción.....	11
Objetivos.....	12
Objetivo general	12
Objetivos específicos.....	12
1. Hipótesis.....	12
Revisión bibliográfica.....	13
2.1 Origen del arándano	13
2.2 El cultivo de arándano en el Ecuador	13
2.3 Morfología.....	13
2.4 Requerimientos edafoclimáticos	14
2.5 Variedades presentes en el Ecuador	14
2.6 Composición nutricional del fruto de arándano	15
2.7 Propagación del arándano	15
2.8 Micropropagación	15
2.9 Etapas de la micropropagación.....	15
2.10 Medio de cultivo.....	16
2.11 Biorreguladores	16
Materiales y métodos.....	18
3.1 Área de estudio.....	18
3.2 Materiales y equipos	18
3.3 Métodos.....	19
3.4 Desarrollo del proyecto.....	20
Elaboración del medio de cultivo WPM	20
Selección del material vegetal (Explantes)	21

Establecimiento del cultivo	22
Metodología para el cumplimiento del objetivo 1	22
Metodología para el cumplimiento del objetivo 2	22
Metodología para el cumplimiento del objetivo 3	23
Resultados.....	23
Número de explantes contaminados a los 21 días.....	23
Efecto de las tres concentraciones de 6-Bencilaminopurina (BAP) y 2-isoPentil adenina (2iP).....	23
Evaluación del número de explantes desarrollados	24
Evaluación de la longitud de yema desarrollada	25
Evaluación del número de hojas en la yema desarrollada.....	25
Costos de aplicación del establecimiento del experimento.....	26
Discusión	28
Conclusiones y recomendaciones.....	30
Anexos	35

Índice de figuras

Figura 1 Ubicación del área de estudio	18
Figura 2 Porcentaje de contaminación de microestacas de arándano in vitro con hipoclorito de sodio al 3% y 5 % en las cvs. Biloxi y Emerald.....	23
Figura 3 Promedio de longitud de yema desarrollada por tratamiento en las cvs. Emerald (A) y Biloxi (B).....	25
Figura 4 Promedio número de hojas por tratamiento en las cvs. Emerald (A) y Biloxi (B)...	26

Índice de tablas

Tabla 1: Materiales y equipos a utilizar en el proyecto.....	18
Tabla 2 Descripción de los tratamientos en el experimento 1 con la variedad Emerald.	19
Tabla 3 Descripción de los tratamientos en el experimento 2 con la variedad Biloxi	19
Tabla 4 Reactivos para el medio WPM.....	20
Tabla 5 Número de explantes desarrollados de arándano in vitro cvs. Biloxi y Emerald.	24
Tabla 6 Costos para la fase de establecimiento.....	26
Tabla 7 Costos para la fase de multiplicación con los biorreguladores BAP y 2iP.	27

Agradecimientos

Agradecemos a Dios por ser la luz en nuestro camino, por darnos salud, sabiduría y fortaleza para alcázar cada uno de nuestros objetivos.

A nuestra familia por brindarnos siempre su apoyo y anhelar siempre lo mejor para nosotros.

A la Universidad de Cuenca y sus docentes que nos compartieron sus conocimientos a lo largo de la carrera, en especial a nuestro tutor de tesis Ing. Segundo Maita y la Ing. Mélida Rocano por brindarnos su conocimiento, apoyo, paciencia, tiempo durante este proceso de titulación.

A nuestros compañeros y amigos, Jazmín, Jennifer y Cristian por su valiosa amistad y por compartir grandes momentos en esta etapa de nuestra vida.

Angélica Cabrera & Daisy Guamán

Dedicatoria

Dedico mi tesis a cada una de las personas que me acompañaron en este proceso de formación por su paciencia, amor y amistad que me apoyaron en todo momento para culminar con éxito mi vida universitaria.

A mi Mami y a mi abuelita Magdalena y Rosa Elena quienes han estado conmigo en cada una de las etapas de mi vida apoyándome y motivándome para que siga adelante y cumpla mis sueños.

A mis hermanos Carlos por siempre estar ahí conmigo para lo que necesite, Raúl, Maricela, y la más pequeñita Cristina que de una manera u otra me acompañaron en este proceso.

Rosa Angelica Cabrera

Dedicatoria

Esta investigación está dedicada a Dios el forjador de mi camino, por haberme otorgado una familia maravillosa y a todas aquellas personas que de una u otra manera ha contribuido para el logro de mis objetivos.

A mis padres Carlos y Esperanza que, con su amor, consejos y apoyo incondicional, he podido cumplir una meta más, a mis hermanas, Karla, Valeria y Marjorie por todos sus consejos y estar siempre conmigo.

A mi esposo Geovanny por su apoyo, amor y confianza, que día a día me brinda y a mis hijos Brandon y Benjamín por ser mi motivación de seguir en adelante.

Daisy Verónica Guamán

Introducción

El arándano (*Vaccinium corymbosum* L) es el cuarto fruto de interés económico a nivel mundial debido a sus propiedades nutricionales, por ser una fuente importante de antioxidantes y vitamina C, potasio, hierro, calcio, beneficiosas para la salud (Jiménez & Abdelnour, 2013).

En el Ecuador este cultivo fue introducido en el año 2015 desarrollándose adecuadamente, presentando mejores características en el tamaño y en los grados brix, además, las condiciones climáticas que tiene el país permiten que la planta produzca todo el año (Gonzales, 2018).

Durante los últimos años se ha incrementado notablemente la demanda del fruto en el país, asimismo, presenta una alta rentabilidad y al ser un cultivo relativamente nuevo no presenta mucha competencia, lo cual ha motivado su desarrollo (Gonzales, 2018).

La producción de arándano en la Sierra ecuatoriana promete ser una alternativa técnica viable que podría satisfacer la demanda existente del producto, así como una fuente importante de ingresos para los agricultores.

La propagación del cultivo se realiza de manera tradicional sexual por semillas y asexual a través de estacas, acodos, sin embargo, esta técnica es lenta e ineficiente no garantiza un buen enraizamiento y permite la proliferación de plagas y enfermedades lo que genera plantas de baja calidad, pérdidas en la producción y bajos rendimientos (Jiménez & Abdelnour, 2017).

La micropropagación es un método alternativo para la propagación de plantas y su principal objetivo multiplicar de manera masiva y en un espacio reducido plantas sanas libres de patógenos en un menor tiempo y genotípicamente uniformes, para satisfacer la demanda (Jiménez & Abdelnour, 2017), a través del cultivo de fracciones de órganos y tejidos de tallos, raíces, embriones, entre otros las yemas son las más usadas como explante y para su obtención es necesario mantener a las plantas madre o donantes bajo condiciones controladas, con un adecuado manejo de riego y nutrición (Roca & Mroginski, 1993).

El medio de cultivo proporciona nutrientes que los explantes necesitan para su desarrollo siendo el medio de cultivo Woody Plant Medium (WPM) para el cultivo de plantas leñosas y en especies que son sensibles a la salinidad (Martínez & Tejacal, 2015). El uso de estos medios de cultivo con diferentes dosis de hormonas como citoquininas inciden en la formación de brotes y raíces de diversas especies, siendo usadas la 6-bencilaminopurina (BAP) y 2-isoPentil adenina (2iP) (Larson & Ríos, 2017).

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el 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.

Objetivos específicos

- Evaluar dos protocolos de desinfección para el establecimiento *in vitro* de brotes de microestacas de arándanos.
- Determinar el efecto de tres concentraciones de 6-Bencilaminopurina (BAP) y 2-isoPentil adenina (2iP) en la multiplicación *in vitro* de brotes de microestacas de arándano.
- Evaluar los costos variables de los tratamientos aplicados.

1. Hipótesis

Ho: La aplicación de los biorreguladores 6-Bencilaminopurina (BAP) y 2-isoPentil adenina (2iP) no tiene efecto en el desarrollo de brotes de microestacas de dos variedades arándano Biloxi y Emerald.

Ha: La aplicación de los biorreguladores 6-Bencilaminopurina (BAP) y 2-isoPentiladenina (2iP) si tiene efecto en el desarrollo de brotes de microestacas de dos variedades arándano Biloxi y Emerald.

Revisión bibliográfica

2.1 Origen del arándano

El arándano (*Vaccinium sp*), es un arbusto pequeño de 0,3-4,5 metros de altura, es originario del hemisferio norte, pertenecientes al género *Vaccinium*, de la familia Ericácea, cuenta con 450 a 500 especies distribuidas ampliamente alrededor del mundo, las especies con mayor importancia económica son *V. corymbosum* L (highbush) y *V. ashei* Reade (Brenes et al., 2015).

2.2 El cultivo de arándano en el Ecuador

El arándano en el Ecuador fue introducido en el año 2015 las plantas fueron traídas de Estados Unidos de la variedad Biloxi debido a que esta se adapta a las condiciones climáticas que presenta el país, actualmente se cultiva en la sierra (Gonzales, 2018), principalmente en la provincia de Pichincha, en el Valle de Guayllabamba, Yaruquí, Valle de los Chillos y Tabacundo. En Imbabura, en el sector de Natabuela, y en Azuay en el cantón Guachapala (Ochoa, 2021).

Se cultiva usando el método semi hidropónico dentro de fundas negras en invernadero lo que nos permite sembrar una alta cantidad de plantas en menor espacio y obtener una mayor producción, una de las principales ventajas que presenta el Ecuador son las condiciones climáticas similares durante todo el año lo que permite tener producción anual permanente para ser competitivos con otros mercados internacionales, sin embargo, existen altas restricciones para la importación de plantas lo que imposibilita el desarrollo de este negocio (Ochoa, 2021).

2.3 Morfología

Raíces: Esta especie presenta raíces finas y fibrosas que carecen de pelos radicales, se encuentran hasta los 25 a 30 cm de profundidad la mayoría están sobre los 36 cm (Carrera,2012; Gough, 1980).

Hojas: son simples, enteras o aserradas, y ubicadas alternamente a lo largo del tallo. Su forma varía ampliamente, desde elípticas, espatuladas, ovalolanceoladas u oval. Pueden tener pubescencia en el envés (Retamales & Hancock, 2012).

Flores: son perfectas y epíginas, ubicadas en racimos simples y emergen de yemas laterales. Posee nectarios en la base de la flor. Se forma de uno hasta dos racimos por nudo (Gil, 2000).

Fruto: El fruto es botánicamente una baya. Color azul oscuro a negro su tamaño varía según las condiciones climáticas, variedad y el manejo que se le dé, presenta una cutícula cerosa

de hasta 5 μm , contiene de una a 20 semillas, pero se ha reportado hasta 65 (Gough, 1994; Retamales & Hancock, 2012; Floras, 2009).

2.4 Requerimientos edafoclimáticos

Suelo

El arándano presenta un óptimo desarrollo en suelos con textura arenosa, arcillosa o franco-arenosa con buen drenaje, el sustrato debe tener un contenido de materia orgánica de 3% a 5% y 50% de agua (Meléndez & Racines, 2021).

El pH en el suelo es determinante en el éxito del cultivo, obteniendo un buen desarrollo entre 4,4 y 5,5 en la producción de los arándanos, para mantener el pH se recomienda realizar el riego con fertilizantes de reacción ácida, sin embargo, es importante verificar la acidez del suelo cada año, para dotar de buenas condiciones al cultivo y obtener un óptimo rendimiento (Gonzales & Robledo, 2017).

Clima

El arándano requiere de horas frío para su desarrollo, dependiendo de la variedad su rango va desde 150 a 1200 horas frío con un umbral de 7 °C en el periodo invernal, durante este puede soportar heladas presentando daños en -0,6 °C siendo este un valor crítico. Estas condiciones influyen en la adaptación de una gran variedad de cultivares de arándanos (Gutiérrez & Peña, 2012).

Terminada la latencia la planta se vuelve susceptible a bajas temperaturas, presentando daños en la floración, proliferación de enfermedades, afectando la producción y las altas temperaturas inciden en la cosecha, el sabor y firmeza del fruto (Gonzales & Robledo, 2017).

Agua

El arándano es muy susceptible al exceso de agua y sensible a su déficit, debido a su sistema radicular, siendo las características del agua un punto crucial para su producción, este cultivo es sensible a la salinidad motivo por el que se debe analizar el agua antes de implementar el sistema de riego (Gonzales & Robledo, 2017).

2.5 Variedades presentes en el Ecuador

Variedad Emerald

Es una variedad temprana altamente productiva con bajos requerimientos de frío, aproximadamente 250 horas, su fruto es de color azul oscuro de excelente sabor, tiene buena adaptación a suelos pesados, presenta resistencia a *Phytophthora* se puede cosechar intervalos de 4 o 5 días y necesita polinización cruzada (García et al., 2018).

Variedad Biloxi

La planta presenta tallos erectos, vigorosos y productivos, de bajo requerimiento de frío, florece y fructifica dos veces al año, el fruto presenta un tamaño de baya mediano con un

buen color, sabor, firmeza y madura tempranamente. Esta variedad se requiere aproximadamente de 350 horas frío, con una temperatura de 7 °C, entre 16 a 20 °C y máximas de 30 °C, propagada en un 90% en *in vitro* (Hernández, 2014).

2.6 Composición nutricional del fruto de arándano

El fruto es fuente de compuestos fenólicos, flavonoides y antocianinas, contiene: proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas y minerales. Su consumo disminuye el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, incide en el crecimiento de células cancerígenas y diabetes (Meléndez & Racines, 2021).

2.7 Propagación del arándano

Según Read (1987), el arándano se propaga tradicionalmente por semillas y enraizamiento de estacas, sin embargo, este método de propagación presenta una serie de complicaciones, dentro de las principales están un bajo porcentaje de enraizamiento, plantas de gran tamaño, bajo o escaso desarrollo radical, número de ramillas limitado. Por estas razones se optó el uso de la técnica de micropropagación *in vitro* que ha demostrado ser la técnica más eficiente al presentar mayor brotación lateral, lo que genera un incremento en la productividad del material vegetal (Jiménez & Abdelnor, 2018).

2.8 Micropropagación

La micropropagación ha sido desarrollada en los años 60 y una de sus principales ventajas es la producción de plantas en grandes cantidades y la multiplicación rápida de material clonal libre de enfermedades (Cañal et al., 2001).

La técnica consiste en la propagación de plantas en un ambiente artificial controlado empleando un medio de cultivo adecuado, se realiza a partir de un fragmento de planta llamado “explante” debido a la propiedad de totipotencia que tienen las células vegetales; la capacidad que presenta para regenerar una planta completa a partir de una célula cuando están sujetas a los estímulos adecuados (Olmos et al., 2010).

2.9 Etapas de la micropropagación

La micropropagación para cualquier especie vegetal pasa por 5 fases que son:

Fase 0 selección de la planta madre

Al momento de seleccionar la planta madre es muy importante tomar en cuenta ciertas características, como que se encuentre en condiciones sanitarias óptimas, con un control adecuado de la nutrición y riego y con producción de fruta con calidad y cantidad óptimas (Villalobos y Thorpe, 1991).

Fase 1 Establecimiento del cultivo

En esta fase la elección del medio de cultivo es fundamental. Después de seleccionar la planta madre, se procede a la recolección de los explantes, los cuales pasarán por una desinfección previa y se debe mantener en condiciones asépticas para realizar el establecimiento *in vitro* en una cámara de flujo laminar (Rosell y Villalobos, 1990).

Fase 2 Multiplicación

El principal objetivo de esta fase es que el explante genere brotes. En esta fase el medio de cultivo juega un papel fundamental (Villalobos y Thorpe, 1991).

Fase 3 Enraizamiento

Dependiendo de la variedad en el proceso de enraizamiento de los brotes se requiere la adición de biorreguladores a base de auxinas, estas pueden ser ácido 3- indolacético (AIA), ácido 2-(1-naftalen acético), (ANA) y ácido indol butírico (AIB) (Villalobos y Thorpe, 1991).

Fase 4 Aclimatación

Esta etapa es muy importante para los cultivos provenientes de propagación *in vitro* debido a que estas plantas no pueden tolerar el cambio de las condiciones ambientales del tubo de ensayo al de un invernadero o vivero. Es fundamental que las plantas presenten buena calidad, para tener un porcentaje más alto de supervivencia *ex vitro*. Se debe mantener la humedad relativa durante 2 a 3 semanas para proteger la planta de la desecación y permitir el crecimiento de raíces y brotes (Gil et al. 2010).

2.10 Medio de cultivo

El medio de cultivo es una solución acuosa que garantiza el suministro de nutrientes al tejido vegetal *in vitro* compuesto de macro y micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, azúcares, agentes gelificantes y reguladores de crecimiento (Perea y Tirado, 2011).

El medio de cultivo Woody Plant Medium (WPM) desarrollado por Lloyd y McCown, 1981 es un medio que presenta una baja concentración en sales NH_4^+ (5 mM), NO_3^- (9,7 mM) y Cl^- (1,3 mM), siendo más usado para el cultivo de plantas leñosas y en especies que son sensibles a la salinidad (Martínez & Tejacal, 2015). Este medio proporciona microelementos y macroelementos esenciales para el cultivo *in vitro* (Rathore, 2005).

Según estudios realizados se ha demostrado que el medio de cultivo WPM es el más recomendado para la propagación de arándano. Tetsumura et al (2008) menciona que el uso del medio de cultivo en la propagación *in vitro* de arándano es importante en el enraizamiento debido a que esté influencia en la calidad de brotes. Wolfe et al (1983) compararon siete diferentes medios para la micropropagación de arándanos *Vaccinium corymbosum* (cv. Bluecrop) demostrando que el medio de cultivo Woody Plant Medium (WPM) (Lloyd y McCown, 1980) es el más apto para el crecimiento de brotes en arándanos.

2.11 Biorreguladores

Los biorreguladores a base de citoquininas promueven la división y diferenciación celular, promoviendo la formación de brotes y raíces de diversas especies de cultivos (Larson & Ríos, 2017).

6-bencilaminopurina (BAP)

Este biorregulador sintético a base de Adenina, se encuentra implicado en la mejora de la proliferación de brotes y elongación (Castillo & Carranza, 2020).

Jiménez & Abdelnour en el año 2017 al evaluar el efecto de tres reguladores del crecimiento en el medio de cultivo WPM al 50%, BAP (0, 3, 5, 10, 15 y 20 mgL⁻¹), Zeatina (0, 0,1, 0.5 mgL⁻¹), obtuvieron que aquellos explantes cultivados con el uso de BAP en las menores concentraciones evaluadas (3 y 5 mgL⁻¹) presentaron una brotación del 23,8% y 12% respectivamente, por lo contrario los explantes cultivados en mayores concentraciones de BAP presentaron formación de callo, observándose los puntos de crecimiento de una organogénesis indirecta.

2-isoPentil adenina (2iP)

Este biorregulador sintético a base de Adenina, se utiliza para promover el crecimiento, y multiplicación de brotes en cultivos actúa como regulador aumentando su rendimiento entre un 20% a 30 % (Castillo & Carranza, 2020).

Hine & Abdelnor (2013), evaluó el efecto de reguladores de crecimiento tipo citocinina 2iP, BAP y CPPU en la brotación de las estacas inmaduras de arándano, en una concentración de 2,5 mg l, se obtuvo mejores resultados con 2iP para las variables longitud y cantidad de hojas de los nuevos brotes en comparación con el testigo. En la investigación *In vitro* of *Vaccinium corymbosum* L. realizado por Georgieva & Kondakova (2021) se evaluó la regeneración, propagación y enraizamiento de 5 variedades de arándano en donde se usó el medio WPM con 3,0 mg/l de zeatina y 2,0 mg/l de 2iP, en donde se encontró que la zeatina y el 2iP son esenciales para la multiplicación efectiva de las 5 variedades de arándano.

En los diferentes estudios que se han realizado se ha podido observar que las concentraciones bajas de los biorreguladores BAP y 2iP han obtenido mejores resultados, que al usar una cantidad más alta según Georgieva & Kondakova (2021) una concentración de 2mg/l de 2iP, demostró tener buenos resultados, en otra investigación realizado por Brenes et al. (2015), en donde se usó la zeatina en concentraciones de 0,5 y 1,0 mg/l para promover la brotación se encontraron diferencias significativas en el tamaño del macollo, y el número de brotes de segmentos de cuatro cultivares de arándano.

Materiales y métodos

3.1 Área de estudio

Descripción del área de estudio. El experimento se desarrolló en la Provincia del Azuay, Cantón Cuenca, en el laboratorio de la facultad de Ciencias Agropecuarias, que se encuentra ubicada a 2590 m s. n. m. Las plantas madre se obtuvieron de un vivero ubicado en el cantón Guachapala propiedad del Ing. Patricio Oñate.

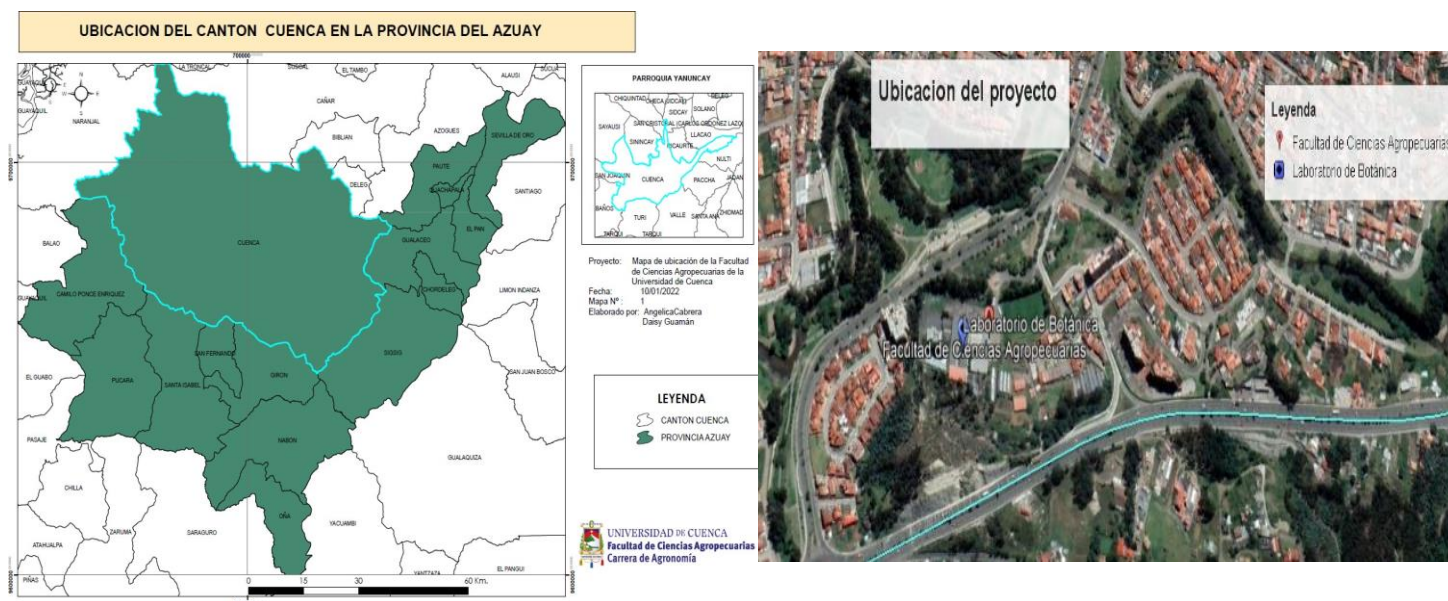


Figura 1 Ubicación del área de estudio

Fuente: Cabrera, A., Guamán (2022)

3.2 Materiales y equipos

Los materiales que se utilizaron en el proyecto se describen en la siguiente tabla 1.

Tabla 1: Materiales y equipos a utilizar en el proyecto.

Físicos	Químicos	Biológicos
Balanza analítica de precisión LTJ303 LABOLAN	Agua destilada	Yemas de arándano variedad Biloxi
350 pH meter JENWAY	Hipoclorito de sodio 5%	Yemas de arándano variedad Emerald
Cocina eléctrica de 1 hornilla UE, 220V, 1000 W	Alcohol al 70-y 90%	

Autoclave Thermo scientific	Medio WPM
Cámara de flujo laminar	Reactivos para el medio WPM
Cristalería	Ácido clorhídrico 0.1 normal
Pinzas	BAP
Bisturí N° 11	2iP
Parafilm	Hidróxido de sodio 0.1 normal
Guantes	Benomil 500 g/kg

Elaborado por: Cabrera, Guamán. 2022

3.3 Métodos

Para la presente investigación se analizaron dos protocolos de desinfección con hipoclorito de sodio al 3% y 5% una vez culminado este proceso se obtuvo material vegetal limpio y se desarrollaron dos experimentos independientes para cada una de las variedades.

En cada experimento se utilizó el medio de cultivo Woody Plant Medium (WPM) como tratamiento control, mientras que, los tratamientos a evaluar consistieron en las combinaciones de los biorreguladores 6-bencilaminopurina (BAP) y 2iP en tres diferentes concentraciones 0,5; 1,0 y 2,0 mg/L añadidos al mismo medio base WPM. Consecuentemente, en cada experimento se evaluaron 7 tratamientos.

Tabla 2 Descripción de los tratamientos en el experimento 1 con la variedad Emerald.

Tratamientos	Descripción	Concentración del Biorregulador
T1E	WPM+Emerald	0,00
T2BE	WPM+BAP+Emerald	0,50
T3BE	WPM+BAP+Emerald	1,00
T4BE	WPM+BAP+Emerald	2,00
T52iPE	WPM+2iP+Emerald	0,50
T62iPE	WPM+2iP+Emerald	1,00
T72iPE	WPM+2iP+Emerald	2,00

Elaborado por: Cabrera, Guamán. 2022

Tabla 3 Descripción de los tratamientos en el experimento 2 con la variedad Biloxi

Tratamientos	Descripción	Concentración del Biorregulador
T1B	WPM+ Biloxi	0,00
T2BB	WPM+BAP+ Biloxi	0,50
T3BB	WPM+BAP+ Biloxi	1,00
T4BB	WPM+BAP+ Biloxi	2,00
T52iPB	WPM+2iP+ Biloxi	0,50
T62iPB	WPM+2iP+ Biloxi	1,00
T72iPB	WPM+2iP+ Biloxi	2,00

Elaborado por: Cabrera, Guamán. 2022

Diseño experimental: Para el presente proyecto se realizó dos experimentos independientes uno para el cv. Emerald y otro el cv. Biloxi se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 2X3, con 7 tratamientos (incluido el control). Se utilizaron 18 repeticiones (tubos de ensayo). La unidad experimental fue 1 explante en un tubo de ensayo.

Análisis estadístico

Se verificó la normalidad de los datos utilizando la prueba de Shapiro Wilks y para la homocedasticidad se usó la prueba de Levene, en caso de cumplir los supuestos de normalidad y homocedasticidad se procedió a realizar el análisis de varianza ANOVA.

3.4 Desarrollo del proyecto

Elaboración del medio de cultivo WPM

Primero se procedió a realizar las soluciones madre o stock, y fueron almacenados en frascos de vidrio para evitar alteraciones por factores externos para lo cual necesitaremos los reactivos que se detallan a continuación.

Tabla 4 Reactivos para el medio WPM

No. solución	Elemento	Cantidad por (5 Unidad litro)
--------------	----------	-------------------------------

	Nitrato de amonio NH_4NO_3	400	mg/l
	Cloruro de calcio $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	96	mg/l
	Sulfato de magnesio $\text{Mg SO}_4 \cdot 7(\text{H}_2\text{O})$	370	mg/l
STOCK 1	Fosfato Monopotásico KH_2PO_4	170	mg/l
	Nitrato de calcio $\text{Ca} (\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	695	mg/l
	Sulfato de potasio $\text{KSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	990	mg/l
	Ácido bórico H_3BO_3	6,2	mg/l
	Sulfato de manganeso $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,5	mg/l
	Sulfato de Zinc $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8,6	mg/l
STOCK 2	Molibdato de sodio Na_2Mo	0,025	mg/l
	Sulfato de cobre CuSO_4	0,025	mg/l
	Na EDTA	37,2	mg/l
STOCK 3	Sulfato Ferroso $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8	mg/l
STOCK 4	INOSITOL	100	mg/l
	Tiamina	1	mg/l
	Ácido nicotínico	0,5	mg/l
VITAMINAS	Piridoxina	0,5	mg/l
	Sucrosa	30	
	Agar	7	

Elaborado por: Cabrera, Guamán. 2022

Cada una de las soluciones stock se mezcló en orden y se aforo en agua destilada, se adiciono la sucrosa y el agar, se lo cocina hasta que se produzca ebullición posteriormente, con la ayuda de una jeringuilla se colocaron 5 cm de medio en cada tubo de ensayo, terminado este proceso se sellaron los tubos en fundas asépticas y se lo llevo a esterilización en la autoclave a una presión de 1.5 bar cm^{-2} o 15 lb por un tiempo de a 20 min.

Selección del material vegetal (Explantos)

Las plantas madre seleccionadas se encontraban bajo condiciones controladas en invernadero. Allí se seleccionaron las plantas que mejores características presentaron de

cada una de las variedades. Las plantas tuvieron aproximadamente 14 meses de edad desde su trasplante a bolsas. Los explantes que se usaron fueron yemas axilares de ramas de 20 cm de largo extraídas de la rama principal de las plantas seleccionadas.

Establecimiento del cultivo

Después de que los explantes pasaron por el protocolo de desinfección se realizaron tres enjuagues con agua estéril en cabina de flujo laminar, con el uso de un bisturí, pinzas y cajas Petri se cortó las microestacas de aproximadamente 0.5-1 cm. Finalmente se procedió a sembrar las microestacas en el medio de cultivo cada microestaca en un tubo de ensayo. para cada microestaca se cortó aproximadamente

Metodología para el cumplimiento del objetivo 1

Objetivo específico 1: **Evaluar dos protocolos de desinfección para el establecimiento *in vitro* de brotes de microestacas de arándanos.**

Protocolo de desinfección

- El material vegetal se colocó en un vaso de precipitación para cada variedad, se lo cubrió con una tela y se lo llevo a chorro de agua durante 5 min.
- Se elimino el agua restante y realizo un enjuague con alcohol al 70% por 20 s.
- Después se lavó el material vegetal 3 veces con jabón líquido y se lo enjuago.
- Posteriormente se sumergió los explantes en un fungicida por 5 min en una dosis de 0.25 ml/L con agua destilada.
- Finalmente, se los introdujo en una solución de hipoclorito de sodio al 3% y al 5% por un tiempo de 5 min.

Variables evaluadas

Número de explantes contaminados a los 21 días

Metodología para el cumplimiento del objetivo 2

Objetivo específico 2: **Determinar el efecto de tres concentraciones de 6-Bencilaminopurina (BAP) y 2-isoPentil adenina (2iP) en la *multiplicación in vitro* de brotes de microestacas de arándano.**

Una vez elaborado el medio de cultivo WPM se adicionó los biorreguladores 6-Bencilaminopurina (BAP) y 2-isoPentil adenina (2iP) en las diferentes concentraciones 0,5%, 1,0 % y 2,0 % para comparar la mejor dosis para el desarrollo de los brotes.

Variables evaluadas

Longitud de los nuevos brotes, que se midieron a los 60 días de establecido el cultivo.

Número de brotes

Número de hojas

Metodología para el cumplimiento del objetivo 3

Objetivo específico 3: **Evaluar los costos variables de los tratamientos aplicados.**

Se determinó los costos de la aplicación de los diferentes tratamientos en base a los costos de los reactivos en el mercado.

Resultados

Número de explantes contaminados a los 21 días

Para determinar la eficiencia de desinfección de hipoclorito de sodio (5%) en microestacas de *Vaccinium corymbosum* L (arándano) cvs. Biloxi y Emerald, se evaluaron dos concentraciones al 3% y 5% durante 5 minutos en cada una de las variedades.

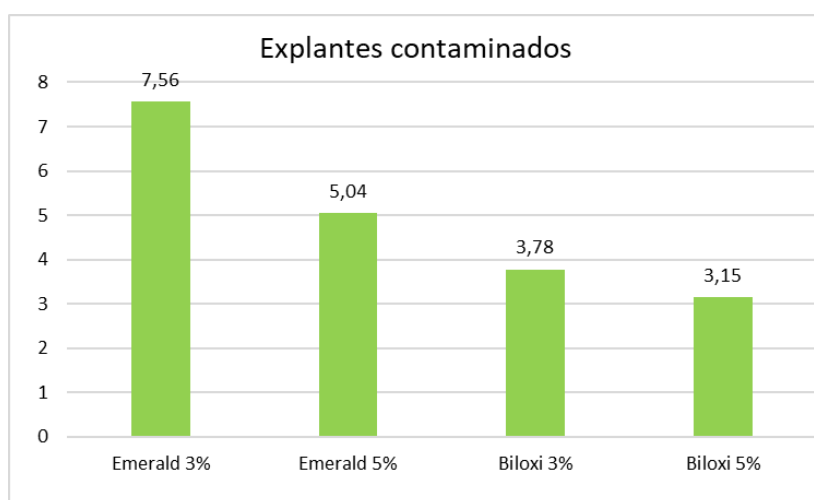


Figura 2 Porcentaje de contaminación de microestacas de arándano in vitro con hipoclorito de sodio al 3% y 5 % en las cvs. Biloxi y Emerald (n=18).

El menor porcentaje de contaminación se registró con hipoclorito de sodio al 5% para las dos variedades, en donde se constató un 3.15 para la cv. Biloxi y 5.04 para la cv. Emerald, con hipoclorito de sodio al 3% se obtuvo mayor contaminación para la cv. Emerald con un porcentaje de 7.56 siendo esta variedad y concentración la que más contaminación presentó.

Efecto de las tres concentraciones de 6-Bencilaminopurina (BAP) y 2-isoPentil adenina (2iP)

En el trabajo de investigación se realizaron dos experimentos uno para la cv. Biloxi y otro para cv. Emerald. En cada uno de los experimentos se aplicaron 7 tratamientos los cuales fueron T1 = Control, T2 = BAP 0.5%, T3 = BAP 1.0%, T4 = BAP 2.0%, T5 = 2iP 0.5%, T6= 2iP 1.0% y T7 = 2iP 2.0%, con 18 repeticiones. Al final del experimento se analizó el número de explantes vivos que había en cada tratamiento, se consideró un explante vivo aquel que tenía la yema desarrollada.

Para determinar el efecto de tres concentraciones de 6-Bencilaminopurina (BAP) y 2-isoPentil adenina (2iP) en la multiplicación *in vitro* de brotes de microestacas de arándano los datos fueron tomados a los 60 días de aplicados los biorreguladores. Se observó varias limitantes, una de ellas, es que no presentaron multiplicación con ninguna de las dosis de los biorreguladores utilizados por lo que tomamos datos de la yema desarrollada, también al utilizar el biorregulador 2iP presentó un alto porcentaje de contaminación en los explantes sembrados, debido a que el 2iP es termolábil es necesario dispensar en cámara de flujo lo que aumentó la tendencia a contaminación.

Después de contabilizar los explantes vivos se registró el número de brotes, finalmente para aquellos explantes que presentaron desarrollo de la yema se analizó los datos de longitud y número de hojas.

Evaluación del número de explantes desarrollados

En esta variable no se encontraron diferencias estadísticamente significativas sin embargo el biorregulador 2iP presentó un mayor número de yemas desarrolladas en los dos cultivares. Con respecto a las dosis, en el cv. Emerald los tratamientos con mayor número de yemas desarrolladas fueron el control y el tratamiento con 2iP al 0,5% con 10 explantes brotados, por el contrario, en los tratamientos con BAP al 2.0% y con 2iP al 2.0% no presentaron explantes brotados. En la variedad Biloxi se mostró mejor desarrollo en las yemas con 2iP al 0,5% y 2iP al 2.0% que presentaron 11 y 10 explantes brotados respectivamente, el control y los tratamientos con BAP al 0.5, BAP al 1% y 2iP al 1% mostraron 6 explantes brotados (Tabla 5).

Tabla 5 Número de explantes vivos, muertos y contaminados de arándano *in vitro* cvs. Biloxi y Emerald (n=18).

Tratamientos	Explantes cv. Emerald			Explantes cv. Biloxi		
	Vivos	Muertos	Contaminados	Vivos	Muertos	Contaminados
T1 Control	10	6	2	6	9	3
T2 BAP 0.5%	5	13	0	6	9	3
T3 BAP 1.0%	6	9	3	6	12	0
T4 BAP 2.0%	0	14	4	7	11	0
T5 2iP 0.5%	10	0	8	11	3	4

T6 2iP 1.0%	4	6	8	6	4	8
T7 2iP 2.0%	0	5	13	10	2	6

Evaluación de la longitud de yema desarrollada

Para la variable longitud de yema brotada los tratamientos con BAP y 2iP no presentaron diferencias estadísticas significativas. En esta variable, aunque no se evidenció diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, si se observó brotación de las yemas, siendo el control, el tratamiento que mostró el mejor promedio para el cv. Emerald con una longitud de 0.8 cm seguido de BAP al 0.5% con 0.6 cm. En el cv. Biloxi el tratamiento con mayor longitud de yema fue con 2iP al 0.5% con 0.99 cm, seguido de BAP al 0.5% con 0.53 cm (Figura 3).

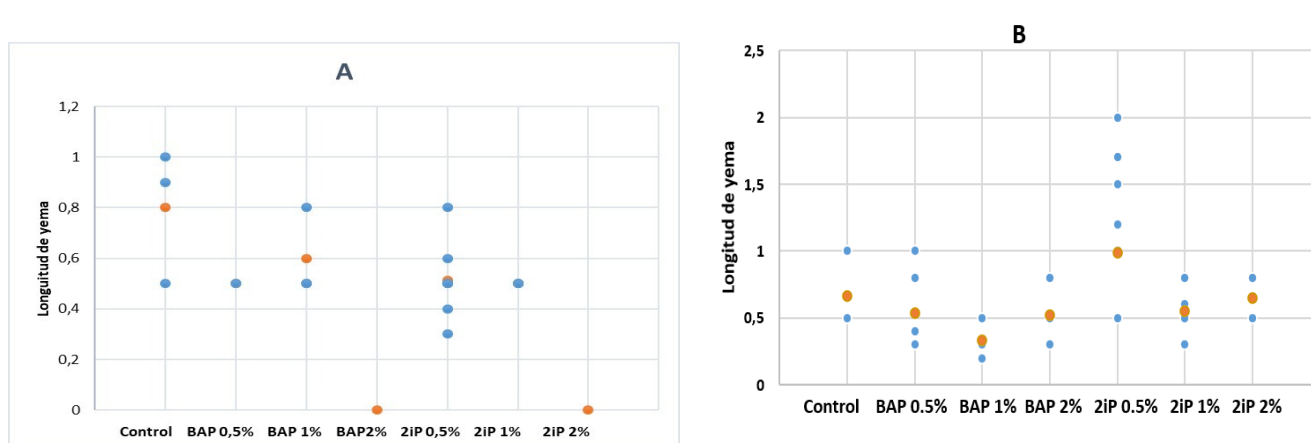


Figura 3 Promedio de longitud de yema desarrollada por tratamiento círculo color naranja en las cvs. Emerald (A) y Biloxi (B) y círculos color azul datos originales.

Evaluación del número de hojas en la yema desarrollada

En la variable número de hojas por yema desarrollada en el cv. Emerald el tratamiento que alcanza su valor más alto es con 2iP y BAP al 0.5% con un promedio de número de hojas de 3,57 y 2.0 respectivamente, mientras que para el cv. Biloxi se obtuvieron mejores resultados con el tratamiento control con un promedio de 3,66 seguido del 2iP al 1,0% con un promedio de 3,25 (Figura 4).

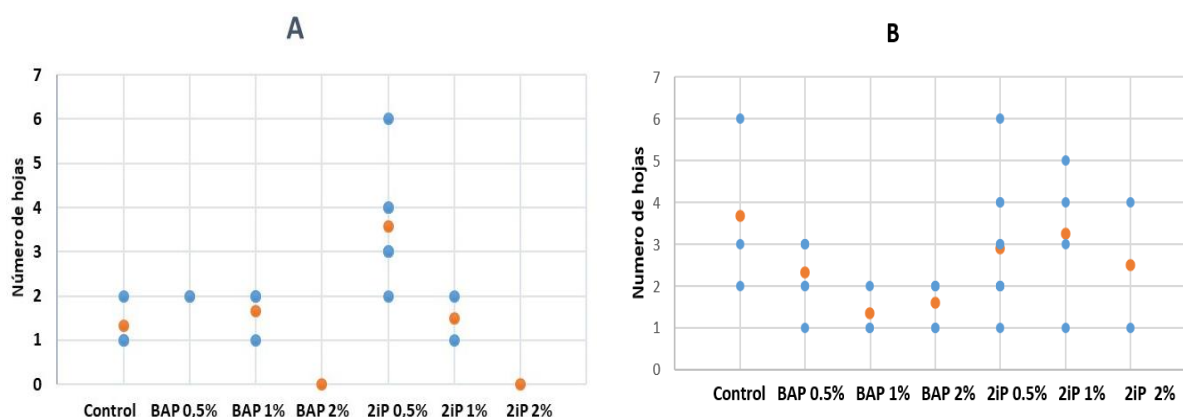


Figura 4 Promedio de número de hojas por tratamiento círculo color naranja en las cvs. Emerald (A) y Biloxi (B) y círculos color azul datos originales.

Costos de aplicación del establecimiento del experimento

Para el análisis económico de los tratamientos se calculó los costos para las dos fases de propagación *in vitro*. Para la fase de establecimiento, se evaluó los dos protocolos de desinfección utilizados y para la fase de multiplicación se valoró el costo de los dos biorreguladores en cada experimento.

Tabla 6 Costos para la fase de establecimiento

Tratamiento	Medio de cultivo	de Explante	Desinfectantes	Hipoclorito de sodio	Total
Hipoclorito de sodio 3%	15,32	25,2	3	0,25	\$ 43,77
Hipoclorito de sodio 5%	15,32	25,2	3	0,5	\$ 44,02

En el análisis de los costos para la fase de establecimiento, la diferencia no es muy significativa entre los dos protocolos. El protocolo con hipoclorito de sodio al 3% tiene un costo de (\$ 43,77), y con hipoclorito de sodio al 5% (\$ 44,02). Se obtuvieron mejores

resultados al usar hipoclorito de sodio al 5% con un menor número de explantes contaminados.

Análisis económico para la fase de multiplicación *in vitro*.

Para el análisis económico en la fase de multiplicación se tomó en cuenta rubros como, medios de cultivo, biorreguladores BAP y 2iP en dosis 0,5%; 1,00% y 2,00% y explantes utilizados en el desarrollo del experimento.

Los costos para los dos cultivares son similares sin embargo se puede observar una variación en cuanto al uso de los biorreguladores los costos más altos se ve al usar el BAP en comparación con el 2iP y en cuanto a las concentraciones se generó un mayor valor al usar las concentraciones más altas (Tabla 7).

Tabla 7 Costos para la fase de multiplicación con los biorreguladores BAP y 2iP.

Tratamientos	costo del medio	costo explante	costo del biorregulador	Total
wpm + biloxi	2,75	0,2		\$ 2,95
wpm+biloxi+BAP 0.5	2,75	0,2	0,11	\$ 3,06
wpm+biloxi+BAP 1.00	2,75	0,2	0,23	\$ 3,18
wpm+biloxi+BAP 2.00	2,75	0,2	0,45	\$ 3,4
wpm+biloxi+2Ip 0.5	2,75	0,2	0,1	\$ 3,05
wpm+biloxi+2Ip 1.00	2,75	0,2	0,2	\$ 3,15
wpm+biloxi+2Ip 2.00	2,75	0,2	0,4	\$ 3,35
wpm+Emerald	2,75	0,2		\$ 2,95
wpm+Emerald+BAP0.5	2,75	0,2	0,11	\$ 3,06
wpm+Emerald+BAP1.00	2,75	0,2	0,23	\$ 3,18

wpm+Emerald+BAP2.00	2,75	0,2	0,45	\$ 3,4
wpm+Emerald+2Ip 0.5	2,75	0,2	0,1	\$ 3,05
wpm+Emerald+2Ip 1.00	2,75	0,2	0,2	\$ 3,15
wpm+ Emerald+2Ip 2.00	2,75	0,2	0,4	\$ 3,35

Discusión

La evaluación de la etapa de introducción a los 21 días mostró que la concentración con hipoclorito de sodio al 5% durante 5 minutos presentó menor contaminación para los dos cultivares evaluados, siendo el cv. Biloxi el que menor porcentaje de contaminación presentó, mientras que con hipoclorito de sodio al 3% durante 5 minutos presentó mayor contaminación en los dos cultivares. Estos resultados concuerdan con los de Ramírez & Carreño (2014) quienes obtienen una mayor contaminación patogénica al evaluar la desinfección de los explantes con hipoclorito de sodio al 3% durante 5 minutos. Por otra parte, señalan que el material vegetal adulto influencia en la contaminación fúngica debido a que la planta madre podría estar contaminada, esto puede evidenciarse con el paso del tiempo al estar en contacto con el medio de cultivo. Es recomendable hacer uso de tejido joven para obtener una mejor eficiencia al momento de usar un desinfectante (Ramírez & Carreño, 2014). Sánchez & Saens (2005) y Ramírez et al., (2014) indican que, existe una estrecha relación entre la concentración del agente desinfectante y el tiempo de exposición para eliminar parte de una población bacteriana.

Número de explantes desarrollados

Al evaluar el efecto de los dos biorreguladores BAP y 2iP en diferentes concentraciones 0,5 %, 1,0 % y 2,0 % para el número de explantes desarrollados en el cv. Biloxi se observó un mejor desarrollo al usar 2iP al 0.5% y para el cv. Emerald presentaron mejor resultado el control y el tratamiento con 2iP al 0,5%, por el contrario, en los tratamientos con BAP y 2iP al 2,0% no presentaron explantes vivos, varios de estos explantes presentaron desecación lo que concuerda con lo obtenido por Jiménez & Abdelnour (2017) quienes indican que los explantes sufren estrés, desecación y daños mecánicos que influyen en el crecimiento, oscurecimiento de los tejidos vegetales y en algunos casos causan la muerte. Sánchez & Sáenz (2005) y Ramírez et al., (2014) mencionan que el alto porcentaje de explantes muertos

se debe principalmente a problemas de hiperhidratación, equipos y herramientas empleadas, similar a lo ocurrido en esta investigación.

Número de brotes por microestaca

Para la variable número de brotes por microestaca no se observaron brotes sino únicamente la yema desarrollada en todos los tratamientos evaluados. Nuestros resultados concuerdan con Aquije (2020) quién obtiene una yema desarrollada por microestaca en la variedad Biloxi al evaluar la respuesta de los explantes con 2iP a concentraciones de 2 mg/L, 2 mg/L + BAP al 0.5 y sin hormona. Quispe (2019), muestra que al evaluar diferentes concentraciones de 2iP y ANA en conjunto obtiene como resultado aproximadamente un brote por microestaca en cada tratamiento lo que concuerda con lo obtenido en este experimento.

En una investigación realizada por Jimenez & Abdelnour (2017), encontraron que los explantes cultivados con BAP en concentraciones de 3 y 5 mgL⁻¹ indujeron brotación en un 23,8% y 12 % respectivamente. Además, mencionan que, en arándano las bajas concentraciones de BAP y 2iP favorecen el desarrollo de las yemas.

Longitud de yema

En cuanto a la longitud de la yema brotada no se evidenció diferencias estadísticas significativas. Se evidenció desarrollo de las yemas, en donde el tratamiento control presentó mejores resultados para el cv. Emerald seguido de BAP al 0.5%. Para el cv. Biloxi se obtuvo una mayor longitud de yema con 2iP al 0.5%, estos resultados coinciden con los de Aquije (2020), quién menciona que en el cv. Biloxi se da un mejor desarrollo de la yema con el tratamiento sin hormona, indica también, que está en discusión la variabilidad genotípica que existe entre variedades y que puede influenciar en la respuesta de los biorreguladores en el desarrollo de los brotes.

Número de hojas

La variable número de hojas no presentó diferencias estadísticas significativas en el presente estudio. El biorregulador que mejores resultados mostró fue el 2iP para los dos cultivares, siendo el tratamiento con 2iP al 1% en el cv. Biloxi, el que mayor número de hojas por yema desarrollada presentó. Hine & Abdelnour (2013), obtuvieron un mayor número de hojas por brote al usar 2iP en una concentración de 2,5 mg, similar al presente estudio, aunque en concentraciones más alta

Conclusiones

El uso de hipoclorito de sodio al 5% durante 5 minutos dentro del protocolo de desinfección presentó menor contaminación de los explantes, siendo el más recomendable para la propagación *in vitro* de los cvs. Biloxi y Emerald.

Las diferentes concentraciones evaluadas de los biorreguladores BAP y 2iP no fueron las adecuadas para generar multiplicación en las microestacas de arándano *in vitro*, pero si promovieron el crecimiento y desarrollo de la yema, siendo el biorregulador 2iP el que mejores resultados presentó.

Al evaluar los costos de los protocolos de desinfección, estos presentaron costos similares. El que mejor resultado presentó fue hipoclorito de sodio al 5%, aunque tuvo un costo más alto.

Al aplicar los tratamientos, el BAP presentó un costo más alto que el 2iP, no obstante, se debe de tomar en cuenta la dificultad del manejo de este biorregulador, debido a que es termolábil y presenta una mayor tendencia a contaminación lo que puede generar costos adicionales.

Recomendaciones

Al no obtener resultados favorables en cuanto a la multiplicación se recomienda evaluar concentraciones más altas de los biorreguladores Bap y 2Ip para obtener multiplicación de los brotes.

En la multiplicación *in vitro* un factor limitante es la contaminación de los explantes por lo que se recomienda llevar un buen manejo y aplicar un adecuado protocolo de desinfección lo que nos ayudará a obtener explantes limpios con lo que se podrá evitar pérdidas económicas y de tiempo.

Referencias

- Aquije, V, (2020). Establecimiento in vitro de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) variedad Biloxi. *Revista de la Escuela Agrícola Panamericana*, 12.
- Brenes, A., Catillo, R., & Gómez, L. (2015). Micropropagación de cuatro cultivares de arándano (*Vaccinium spp*) a partir de segmentos foliares de dos procedencias. *Agronomía costarricense*, 7-23.
- Cañal, M., Rodríguez, R., Fernández, B., Sánchez, R., & Majada, J. (2001). Fisiología del cultivo in vitro. *Biotecnología Vegetal*, 1-1.
- Carrera, J. (2012). Manual práctico para la creación y desarrollo de plantaciones de arándano en Asturias. *Ministerio de Medio Ambiente Rural y Marino Gobierno de España*, 60.
- Castillo, L., & Carranza, C. (2020). Efecto de 6-bencilaminopurina y nitrato de potasio sobre la micropropagación in vitro de *Laelia anceps* subsp. *anceps* (*Orchidaceae*). *Biotecnia*, 2-7.
- Floras. (2009). *Vaccinium corymbosum* L. Flora of North América. *Base de datos botánicos*, 371,516,526.
- Frías, M., & Hochberg. (2007). Nomenclatura Internacional de la UNESCO para los campos de Ciencia y Tecnología. *UNESCO*.
- García, J., García, G., & Ciordia, M. (2018). El cultivo de arándano en el Norte de España. Servicio Regional de Investigación Y desarrollo Agroalimentaria (SERIDA).
- Georgieva, M., & Kondakova, V. (2021). In vitro propagation of *Vaccinium corymbosum* L. *Bulg. J. Agric. Sci*, 323-327.
- Gil, A., López, S., & López, A. (2010). Aclimatación de plántulas in vitro de *Saintpaulia ionantha* (*Gesneriaceae*) "violeta africana" a condiciones de invernadero. *Arnaldoa*, 343-350.
- Gil, G. (2000). Fruticultura: La producción de fruta. Frutas de clima templado y subtropical y uva de vino. *Facultad de Agronomía Pontificia Universidad Católica de Chile*, 590.
- Gonzales, A., & Robledo, P. (2017). Manual de manejo agronómico del arándano. Instituto de Desarrollo Agropecuario. *Instituto de Investigaciones Agropecuarias de Chile*, 20-22.

Gonzales, P. (2018). Cultivo de arándanos. *Revista Lideres*, 1.

Gough, R. (1994). The Highbush Bñueberry Its Management US, New York, Binghamton. Food product press, 267.

Gutiérrez, M., & Peña, F. (2012). Estimación del área foliar del arándano (*Vaccinium corymbosum*) por medio de un método no destructivo. *Universidad de Ciencias Aplicadas y Divulgación Científica*, 334.

Hernández, H. (2014). Estudio nutrimental de arándano azul (*Vaccinium corymbosum*) en los Reyes-Michoacán Instituto de enseñanzas e Investigación. *Ciencias Agrícolas*, 24.

Hine, A., & Aldenor, A. (2013). Establecimiento in vitro de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.). *Tecnología en marcha*, 64-71.

Jiménez, V., & Abdelnor, A. (2018). Protocolo de micropropagación de arándanos nativos de Costa Rica (*Vaccinium consanguineum*). *Tecnología en marcha*, 144-159.

Jiménez, V., & Abdelnour, A. (2017). Protocolo de micropropagación de arándano nativo de Costa Rica (*Vaccinium consanguineum*). *Tecnología en marcha*, 146.

Larson, C., & D, R. (2017). Efecto del genotipo y fuente de citoquinina en la etapa de iniciación de cultivo in vitro de tejido adulto de *Castanea sativa*. *Guayana Botánica*, 30-40.

Martínez, Y., & Tejacal, I. (2015). *Efecto de las sales inorgánicas del medio de cultivo en el crecimiento de pascuíta (Euphorbia leucocephala L.)*. México: Chapingo.

Meléndez, M., & Racines, M. (2021). *Vaccinium spp.: Características cariotípicas y filogenéticas, composición nutricional, condiciones edafoclimáticas, factores bióticos y microorganismos benéficos en la rizosfera*. *Scientia Agropecuaria*, 12.

Ochoa, C. (2021). Ecu arándano. *Revista Inhaus*, 1.

Olmos, s., Luciani, G., & Galdeano, E. (2010). Capítulo 1 Micropropagación. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal III*, 353-362.

Perea, M., & Tirado, A. (2011). Cultivo de tejidos in vitro. Manual de prácticas de laboratorio. *Facultad de Ciencias Departamento de Biología*. Bogota.

- Ramírez, L., Moren, J & Carreño, N. (2014). Evaluación del efecto de tratamientos de desinfección con hipoclorito de sodio sobre segmentos nodales de *Guadua angustifolia* Kunth para el establecimiento del cultivo in vitro. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 1.
- Rathore, J., Vinod, N., Shekhawat, N., Sigh, R. L., Phulmaria, M., & Dagla, H. (2005). *Micropropagation de woody plants*. India: Unidad de Biotecnología JNV.
- Read, P., & al, e. (1987). Field performance of in vitro propagated blueberries Comb. Proc. Intl Plant Prop. Intl Plant Prop, 450-452.
- Retamale, J., & Hancock, J. (2012). Blueberries. US. Cambridge, Massachusetts, Center for Agricultural. *Biosence International*, 323.
- Roca, W., & Mroginski, L. (1993). Cultivo de Tejidos en la Agricultura Fundamentos y Aplicaciones. Colombia: CIAT.
- Rosell, C., & Villalobos, V. (1990). Fundamento teórico-práctico del cultivo de tejidos vegetales. Roma: In FAO.
- Tetsumura, J., Vinod, N., Sato, M., C, H., Yamashita, K., Komatsu, H., & Kunitake, H. (2008). Evaluation of basal media for micropropagation of four highbush blueberry cultivars. *Scientia Horticulturae*, 72-74.
- Villalobos, V. M., & Thorpe, T. (1991). Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. CIAT

Anexos

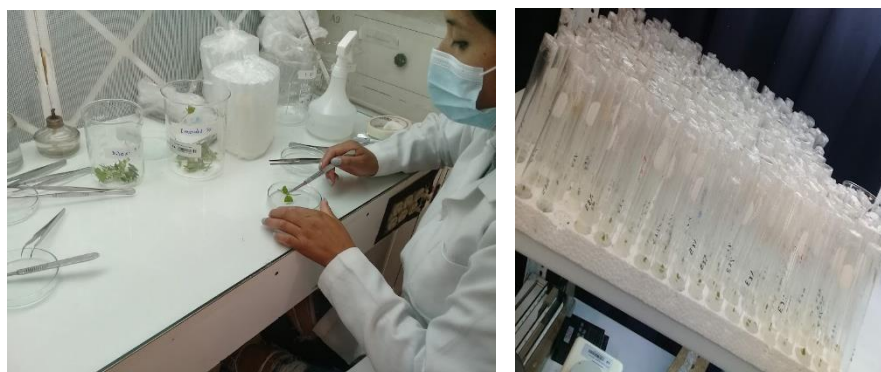
Anexo A Elaboración de soluciones madre y medio de cultivo



Anexo B Protocolo de desinfección



Anexo C Siembra de explantes



Anexo D Resultados protocolo de desinfeccion



Anexo E Repique con los biorreguladores Bap y 2iP



Anexo F Resultados con el uso de los biorreguladores



