

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



T E S I S

**ESTABLECIMIENTO AXÉNICO Y MULTIPLICACIÓN CLONAL DE
PLÁNTULAS *IN VITRO* DE ARÁNDANO (*Vaccinium corymbosum*, var. "Biloxy")**

Para optar el Título Profesional de:
INGENIERO AGRÓNOMO

Presentado por la Bachiller:
KAREN JANIS ARANA DIONISIO

Asesores:

Dr. Segundo Berardo Escalante Zumaeta
Ing. Manuel Malpica Rodríguez

CAJAMARCA – PERÚ

2024



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

"NORTE DE LA UNIVERSIDAD PERUANA"
Fundada por ley 1405 del 13 de febrero de 1962
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS



CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE TESIS REVISADA EN EL SOFTWARE ANTIPLAGIO TURNITIN DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA.

La que suscribe docente y asesor de la Escuela Académico Profesional de Agronomía, Facultad de Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional de Cajamarca, hace constar que:

La tesis, y/o Trabajo de Suficiencia Profesional Titulada:

Establecimiento axénico y multiplicación clonal de plántulas *in vitro* de Arándano (*Vaccinium corymbosum*, var. "Biloxy")

Presentada por la Bach: KAREN JANIS ARANA DIONISIO ha sido sometida a revisión mediante el software TURNITIN, por parte del asesor: Dr. Segundo Berardo Escalante Zumaeta, obteniendo el puntaje de **21%** de similitud.

Cajamarca, 21 de febrero del 2024.

Dr. Berardo Escalante Zumaeta

ASESOR



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
"NORTE DE LA UNIVERSIDAD PERUANA"
Fundada por Ley N° 14015, del 13 de febrero de 1962
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
Secretaría Académica



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Cajamarca, a los veinticinco días del mes de octubre del año dos mil veintidós, se reunieron en el ambiente **2C - 202** de la Facultad de Ciencias Agrarias, los miembros del Jurado, designados según **Resolución de Consejo de Facultad N° 050-2022-FCA-UNC**, de fecha **02 de marzo del 2022**, con la finalidad de evaluar la sustentación de la **TESIS** titulada: "**ESTABLECIMIENTO AXÉNICO Y MULTIPLICACIÓN CLONAL DE PLÁNTULAS IN VITRO DE ARÁNDANO (*Vaccinium corymbosum* L. var. Biloxy)**", realizada por la Bachiller **KAREN JANIS ARANA DIONISIO** para optar el Título Profesional de **INGENIERO AGRÓNOMO**.

A las diecisiete horas y veinticinco minutos, de acuerdo a lo establecido en el **Reglamento Interno para la Obtención de Título Profesional de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cajamarca**, el Presidente del Jurado dio por iniciado el Acto de Sustentación, luego de concluida la exposición, los miembros del Jurado procedieron a la formulación de preguntas y posterior deliberación. Acto seguido, el Presidente del Jurado anunció la aprobación por unanimidad, con el calificativo de dieciséis (16); por tanto, la Bachiller queda expedita para proceder con los trámites que conlleven a la obtención del Título Profesional de **INGENIERO AGRÓNOMO**.

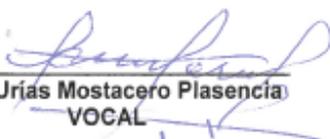
A las diecinueve horas y veinte minutos del mismo día, el Presidente del Jurado dio por concluido el Acto de Sustentación.



Dr. Juan Francisco Seminario Cunya
PRESIDENTE



Dr. Manuel Salomón Rohcal Ordóñez
SECRETARIO



Ing. Urías Mostacero Plasencia
VOCAL



Dr. Segundo Berardo Escalante Zumaeta
ASESOR

AGRADECIMIENTO

Expreso mi más sincero agradecimiento a:

Al Doctor Berardo Escalante Zumaeta, asesor de la presente tesis por sus lecciones, orientación y apoyo en mi investigación.

Al Ingeniero Manuel Malpica Rodríguez, por brindarme el conocimiento y dedicación, así como sus sugerencias sin las cuales no hubiera sido posible la elaboración de este trabajo.

A la Ingeniero Teresita del Niño Jesús, por su apoyo en la etapa de instalación de mi proyecto.

A mis amigos y compañeros de la Escuela de Agronomía, por sus muestras de interés y apoyo.

LA AUTORA

AGRADECIMIENTO

Expreso mi más sincero agradecimiento a:

Al Doctor Berardo Escalante Zumaeta, asesor de la presente tesis por sus lecciones, orientación y apoyo en mi investigación.

A mis amigos y compañeros de la Escuela de Agronomía, por sus muestras de interés y apoyo.

LA AUTORA

ÍNDICE DE CONTENIDO

Contenido	Página
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	v
INDICE DE TABLAS	viii
INDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMEN	xii
ABSTRACT.....	xiii
CAPITULO I	1
INTRODUCCION	1
CAPITULO II.....	4
REVISION BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Antecedentes de la investigación	4
2.2 Bases teóricas	7
2.3 Definición de Términos Básicos	14
CAPITULO III.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1 Ubicación geográfica del trabajo de Investigación	17
3.2 Metodología	19
3.2.1 Desinfección y prevención de la oxidación de explantes.	20
3.2.2 Siembra <i>in vitro</i>	24
3.2.3 Clonaje <i>in vitro</i>	26
3.2.4 Enraizamiento <i>in vitro</i>	28
CAPITULO IV.....	31
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	31
4.1 Desinfección y prevención de la oxidación de explantes.	31
4.1.1 Efecto de cuatro soluciones desinfectantes en el control de microorganismos contaminantes del cultivo <i>in vitro</i> de arándano.....	31
4.1.1 Explantes axénicos.....	32
4.1.2 Explantes Contaminados.....	33
4.1.3 Efecto de las soluciones antioxidantes ácido ascórbico y ácido cítrico en el control de la fenolización de explantes <i>in vitro</i> (yema axénica) de arándano.....	34
4.2 Efecto de dos medios de cultivo Murashige & Skoog 1962 y McCown Woody Plant Medium 1980 y cinco dosis de 2 isopentenyl adenina en el establecimiento.	37

4.2.1	N° Hojas por brote	37
4.2.2	N° Tallos	40
4.2.3	Longitud de brote	43
4.3	Efecto de 2 isopentenyl adenina en la multiplicación o clonal <i>in vitro</i> de arándano.	45
4.4	Efecto de cuatro dosis de AIB para el enraizamiento <i>in vitro</i> de plántulas de arándano.	47
4.4.2	Longitud de raíz	48
4.4.3	Número de Raíces	49
4.4.4	Peso Fresco y seco de las plántulas in vitro de arándano.	50
CAPITULO V		54
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		54
CAPITULO VI.....		55
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....		55
ANEXOS		58

INDICE DE TABLAS

Tablas	Página
Tabla 1 <i>Componentes químicos del medio de cultivo Murashige and Skoog (1962).</i>	12
Tabla 2 <i>Componentes químicos del medio McCown Woody Plant Medium (1981).</i>	13
Tabla 3 <i>Tratamientos en estudio para establecimiento in vitro Arándano.</i>	26
Tabla 4 <i>Tratamiento en estudio en la fase de enraizamiento.</i>	28
Tabla 5 <i>Número y porcentaje de explantes axénicos por tratamiento.</i>	31
Tabla 6 <i>Porcentaje de explantes axénicos.</i>	32
Tabla 7 <i>(ANVA) para el número de explantes contaminados por tratamiento.</i>	33
Tabla 8 <i>Prueba de Tukey al 5% para el número promedio de explantes contaminado por tratamiento. Evaluación realizada a los 18 días de la siembra in vitro.</i>	34
Tabla 9 <i>ANVA para factor Número de explantes oxidados por tratamiento. Datos transformados con $Y = X + 1$</i>	35
Tabla 10 <i>ANVA para el efecto del medio de cultivo y dosis de 2ip en el número de hojas por brote. Datos obtenidos a los 90 días de evaluación y transformados con: $Y = X + 1$</i>	37
Tabla 11 <i>Prueba de Tukey al 5% para el efecto de dos medios (MS al 50% de concentración salina y WPM) en el número promedio de hojas por brote.</i>	38
Tabla 12 <i>Prueba de Tukey al 5% para el efecto de dosis de 2ip (2isopentyladenina) en el número de hojas por brote.</i>	39
Tabla 13 <i>ANVA para los efectos del medio de cultivo y las dosis de 2 ip en el número de brotes por explante (micro tallo). Datos registrados a los 90 días de evaluación y transformados $Y = \sqrt{X+1}$.</i>	40
Tabla 14 <i>Prueba de Tukey al 5% para el efecto del medio de cultivo en el número de brotes por explante (micro tallo).</i>	41
Tabla 15 <i>Prueba de Tukey al 5% para el efecto de las dosis de 2ip en el número de brotes por explante (micro estaca).</i>	41
Tabla 16 <i>Prueba de Tukey con 5% para determinar la influencia de la interacción entre el medio de crecimiento y la dosis de 2ip en el número medio de brotes por explanta (microestaca).</i>	42
Tabla 17 <i>ANVA para el efecto del medio de cultivo y las dosis de 2 ip en la longitud promedio de brotes por explanta. Datos registrados a los 90 días de evaluación y transformados con $Y = \sqrt{X+1}$</i>	43
Tabla 18 <i>Prueba de Tukey al 5% para el efecto de los medios MS y WPM en la longitud promedio de brotes por explante.</i>	43
Tabla 19 <i>Prueba de Tukey al 5% para la eficacia de la dosis de 2 ip en la longitud promedio de brotes por explante.</i>	44
Tabla 20 <i>Clasificación de los tallos obtenidos en el establecimiento en función a su vigor.</i>	45
Tabla 21 <i>ANVA para el efecto del tipo de vigor en el brote de la tasa de multiplicación in vitro. Datos registrados a los 90 días de la siembra in vitro y transformados con: $Y = \sqrt{X+1}$</i>	46
Tabla 22 <i>Prueba de Tukey al 5% sobre la influencia de los grados de vigor sobre el número promedio de explantes multiplicados para determinar la tasa de multiplicación en las plántulas in vitro.</i>	46
Tabla 23 <i>Porcentaje de enraizamiento in vitro en plántulas de arándano según su tratamiento en estudio.</i>	47

Tabla 24 ANVA para el efecto de cuatro diferentes concentraciones de AIB en la longitud (cm) promedio de raíz. Datos transformados $Y=\sqrt{X+1}$	48
Tabla 25 Prueba de Tukey al 5% sobre la influencia de las 4 dosis de AIB en la variable longitud promedio de raíz por plántula.	49
Tabla 26 ANVA para el efecto de dosis de AIB en el número de raíces. Datos transformados $Y=\sqrt{X+1}$	49
Tabla 27 Prueba de Tukey al 5 % para el efecto de AIB en el número de raíces por micro estaca.	50
Tabla 28 Pesos fresco y seco de las plántulas in vitro de arándano, datos registrados a los 71 días del enraizamiento in vitro.	51
Tabla 29 ANVA para el efecto de dosis de AIB en el peso fresco de las plántulas in vitro de arándano. Datos registrados a los 40 días de la siembra in vitro y transformados $Y=\sqrt{X+1}$	51
Tabla 30 Prueba de Tukey al 5 % para el efecto de la dosis de AIB en el peso fresco las plántulas in vitro de arándano.	52
Tabla 31 ANVA para efecto de la dosis de AIB en el peso seco de las plántulas in vitro de arándano. Datos registrados a los 60 días de instalado el cultivo y transformados con $Y=\sqrt{X+1}$	52
Tabla 32 Prueba de Tukey al 5 % para el efecto de la dosis de AIB en el peso seco promedio de las plántulas in vitro de arándano.	53
Tabla 34 Conteo de N° de micro estacas contaminados y oxidados en función al tiempo de evaluación. Para definir el porcentaje de sobrevivencia.	58
Tabla 35 Resultados de la evaluación de las factores estudiados por tratamiento.	59
Tabla 36 Resultados de N° de hojas de la fase de establecimiento.	60
Tabla 37 Resultados de N° de tallos en la fase de establecimiento.	60
Tabla 38 Resultados para Altura de brote en la fase de establecimiento.	61
Tabla 39 Resumen de la clasificación y conteo de 4 tipos de vigor para realizar el ciclo de clonaje. .	62
Tabla 40 Promedio de variables evaluadas para determinar la tasa de multiplicación según grados de vigor.	63
Tabla 41 Promedio de datos obtenidos sobre la influencia de los tratamientos para determinar el enraizamiento en las plántulas in vitro.	64
Tabla 42 Resultados evaluados en longitud de raíz para la fase de enraizamiento.	64
Tabla 43 Resultados para número de raíces en la fase de enraizamiento.	65
Tabla 44 Resultados para la fase de enraizamiento para la variable peso fresco.	66
Tabla 45 Resultados para la fase de enraizamiento para la variable peso seco.	67

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1 <i>Plantas de arándano procedentes de Vivero “Santa Fe” - Cajamarca.</i>	20
Figura 2 <i>Plantas seleccionadas para establecimiento in vitro.</i>	20
Figura 3 <i>Soluciones de desinfectantes para los tratamientos T1 y T3.</i>	22
Figura 4 <i>Explantes cortados para proceso de desinfección.</i>	22
Figura 5 <i>Soluciones desinfectantes y antioxidantes: a) Desinfección tratamiento T1 y T3 b) Desinfección tratamiento T2 y T4.</i>	22
Figura 6 a) <i>Explantes desinfectados b) Corte de yemas axiales de arándano aproximadamente 1cm. c) Explantes almacenados en cámara oscura por 15 días. d) Explante recién sembrado dentro de tubos de ensayo.</i>	23
Figura 7 <i>Realización de cortes a los explantes con segmentos uninodales.</i>	24
Figura 8 <i>Siembra in vitro en etapa de establecimiento.</i>	25
Figura 9 <i>Explante uninodal de arándano recién sembrado.</i>	25
Figura 10 <i>Explantes obtenidos de la fase anterior a clonar.</i>	27
Figura 11 <i>Segmentación de una plántula in vitro de arándano.</i>	27
Figura 12 <i>Explantes segmentados con una yema de una plántula de arándano.</i>	27
Figura 13 <i>Plántulas in vitro seleccionadas de la fase de multiplicación para inocularse en medio de enraizamiento.</i>	28
Figura 14 <i>Corte de yema apical y callo a plántula de arándano para ser sembrado en medio para enraizamiento.</i>	29
Figura 15 <i>Plántulas in vitro de arándano sembradas en medio para enraizamiento.</i>	29
Figura 16 <i>Vista de mirco tallos oxidados después del proceso de desinfección.</i>	34
Figura 17 <i>Número promedio de explantes contaminados y oxidados en función al tratamiento en estudio.</i>	36
Figura 18 <i>Porcentaje de explantes axénicos del cultivo de arándano en función al tratamiento en estudio.</i>	36
Figura 19 <i>Acondicionamiento de cámara de flujo laminar horizontal para realizar la siembra in vitro.</i>	68
Figura 20 <i>Preparación de materiales estériles para la siembra in vitro.</i>	68
Figura 21 <i>Fase de formación y desarrollo de una micro estaca de arándano en etapa de establecimiento.</i>	69
Figura 22 <i>Explantes procedente de medio WPM (Tratamientos 1-5).</i>	69
Figura 23 <i>Explantes procedente de medio MS (Tratamiento 6-10).</i>	70
Figura 24 <i>Explantes multiplicados según Vigor 1, 2 y 3.</i>	70
Figura 25 <i>Explantes en fase de enraizamiento según tratamiento 1 y 2.</i>	71
Figura 26 <i>Explantes en fase de enraizamiento según tratamiento 3 y 4.</i>	71
Figura 27 <i>Materiales para realizar proceso de peso fresco y peso seco.</i>	72

Figura 28 <i>Muestras de tallos y raíces según tratamientos (1-4)</i>	72
Figura 29 <i>Muestras de plántulas ex vitro según tratamientos (1-4)</i>	73
Figura 30 <i>Muestras de plántulas ex vitro colocados en estufa</i>	73
Figura 31 <i>Muestras secas de plántulas ex vitro según tratamientos (1-4)</i>	74

RESUMEN

El laboratorio de Biotecnología Vegetal, de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cajamarca – Perú; sirvió como sede para realizar el estudio que tuvo como objetivo determinar el establecimiento axénico y multiplicación clonal de plántulas *in vitro* de Arándano (*Vaccinium corymbosum* Var. Biloxy); a 26 °C, 40 % de humedad y 16 horas de luminosidad (horas lux). Concluida la investigación se determinó. Que los explantes expuestos a desinfección y oxidación, utilizando 1% de jabón, 70% de alcohol, 1,5 % hipoclorito de sodio y 0,5 ml de Tween, se obtuvo 66.6% de prendimiento. Referente al número promedio de hojas en dos medios de cultivo, más cinco dosis de la fitohormona 2ip (2isopentyladenina); se reporta que los explantes dispuestos en medio Murashige generaron 11 hojas por explante y en medio Woody Plant Medium (WPM) 17 hojas. Para el ensayo de multiplicación clonal, los explantes se categorizaron en cuatro grados de vigor; éstos, luego de estar dispuestos en medio WPM, con 4 ppm de 2ip; influyó en la generación de 6,88 unidades promedio de brotes, por explante del vigor tres. El medio adecuado para enraizamiento corresponde a WPM, más 1 ppm de Ácido Indol Butírico (AIB), aplicado en 4 oportunidades; obteniendo 96 %; de igual manera ocurrió en longitud promedio de raíces, obteniendo 1,34 cm; el número promedio de raíces, fue de 3,17 unidades. Evaluando peso fresco y seco, se determinó la eficiencia de absorción de nutrientes.

Palabras clave: *Vaccinium corymbosum*, explante, axénico.

ABSTRACT

The Plant Biotechnology Laboratory of the Faculty of Agricultural Sciences. Universidad Nacional de Cajamarca - Peru; served as headquarters to carry out the study whose objective was to determine the axenic establishment and clonal multiplication of Blueberry (*Vaccinium corymbosum* Var. *Biloxy*) seedlings in vitro; at 26 °C, 40% humidity and 16 hours of luminosity (lux hours). At the end of the investigation it was determined. That the explants exposed to disinfection and oxidation, using 1% soap, 70% alcohol, 1.5 % sodium hypochlorite and 0.5 ml of Tween, obtained 66.6 % of budding. Regarding the average number of leaves in two culture media, plus five doses of the phytohormone 2ip (2isopentyladenine), it is reported that the explants arranged in Murashige medium generated 11 leaves per explant and in Woody Plant Medium (WPM) 17 leaves. For the clonal multiplication trial, the explants were categorized into four vigor grades; these, after being arranged in WPM medium, with 4 ppm of 2ip, influenced the generation of 6.88 average units of shoots per explant of vigor three. The adequate medium for rooting corresponds to WPM, plus 1 ppm of Indole Butyric Acid (IBA), applied 4 times, obtaining 96%; the same occurred in average root length, obtaining 1.34 cm; the average number of roots was 3.17 units. By evaluating fresh and dry weight, the efficiency of nutrient absorption was determined.

Keywords: *Vaccinium corymbosum*, explant, axenic.

CAPITULO I

INTRODUCCION

El arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) arbusto de la familia Ericaceae, originario de Norte América. El género cuenta con más de 500 especies, distribuidas por el hemisferio norte. De las especies, el 25% son nativas de Norteamérica, el 10% de Centroamérica y Sudamérica, y el 35% de América. (Song y Hancock, 2011).

Las bayas de color azul oscuro o rojizo se consideran super frutas de excelente valor nutritivo y económico, y se clasifican como bayas. Después de su introducción al sistema agrícola peruano, a inicios del presente siglo, su cultivo ha tenido una rápida extensión debido a su alta rentabilidad y la existencia de una ventana comercial oportuna que permite exportar el producto con poca competencia internacional (MINAGRI, 2016).

Existen dos grupos según su requerimiento climático: 'Berkeley', 'Bluecrop', 'Bluetta', 'Brigitte', 'Duke', 'Elliot', 'Jersey' (clima alto norte), 'Biloxy', 'Emerald', 'Jewel', 'Misty', 'O'Neal' (clima alto sur) (MINAGRI, 2016). El requerimiento de horas frío es de 400 a 1,200 con 7°C. De 18° a 22°C es el intervalo ideal para el crecimiento de las raíces, mientras que de 20° a 26°C lo es para los brotes, las hojas y los frutos. (INIA- INDAP, 2021).

Considerando las características agroclimáticas, como vientos, periodos de heladas o fríos, suelo, entre otros, se identificaron las variedades Biloxy, Misty y Legacy, las cuales se adaptan en Cajamarca y otras zonas similares del país, como áreas potenciales para la producción comercial de arándanos de exportación. (MINAGRI, 2016).

En la Región Cajamarca existe una variedad del género *Vaccinium* L. El pushgay (*Vaccinium floribundum* H.B.K), planta conocida como el "arándano de los Andes" por su parecido con el arándano norteamericano. En las laderas de las montañas hay especies silvestres que se regeneran de forma natural. Son marginales en cuanto a producción estacional y consumo, y sus frutos se procesan a mano. (Guevara Cruzado, 2017).

El valor comercial y ecológico del arándano ha despertado el interés por crear plantaciones; sin embargo, la propagación vegetativa no es una opción para la producción masiva de material de plantación, ya que se necesitaría un gran número de plantas madre debido al escaso enraizamiento de los esquejes (Ostroluka *et al*, 2007). Los métodos de propagación *in vitro* incluyen la regeneración de brotes a partir de segmentos de hoja y la brotación directa a partir

de explantes de tallo, tanto de plantas adultas como juveniles. (Debnath y MacRae *et al*, 2001). La micropropagación permite establecer plantas axénicas (libres de microorganismos patógenos) por medio de técnicas de desinfección previniendo la oxidación de tejidos vegetales permitiendo su desarrollo, crecimiento, multiplicación y enraizamiento.

Además, la tecnología *in vitro* ofrece ventajas como requerir menos material de partida para la producción masiva de plantas, producir plántulas en cualquier época del año en lugares diminutos y permitir la mejora genética. (Castro Fernández, 2016).

Por esta razón decidimos realizar la presente investigación para establecer un protocolo de micropropagación a partir de yemas axilares y la multiplicación clonal de plántulas *in vitro* de arándano variedad Biloxy.

1.1 Formulación del problema

¿Pueden establecerse de manera axénica y multiplicarse clonalmente *in vitro* plántulas de arándano (*Vaccinium corymbosum*, var. "Bilox") utilizando soluciones desinfectantes y antioxidantes, así como un medio de cultivo que contenga reguladores del crecimiento?

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Realizar el establecimiento axénico por medio de uso de soluciones desinfectantes y antioxidantes, además de medio de cultivo y reguladores de crecimiento para la multiplicación clonal de plántulas *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum*, var. "Bilox")

1.2.2 Objetivos específicos

Comprobar la eficacia de cuatro tratamientos desinfectantes para controlar microorganismos contaminantes en el cultivo *in vitro* de arándano.

Investigar la influencia de soluciones antioxidantes (ácido ascórbico y ácido cítrico) en la regulación de la fenolización en explantes de arándano (yema axénica).

Determinar el efecto de dos medios de cultivo Murashige & Skoog 1962 y McCown Woody Plant Medium 1980 y cinco dosis de 2 isopentenyl adenina en el establecimiento y la multiplicación o clonal *in vitro* de arándano.

Determinar el efecto de cuatro dosis de la auxina AIB para el enraizamiento *in vitro* de plántulas de arándano.

1.3 Hipótesis

La desinfección de superficies, el control de la oxidación, el tipo de medio de cultivo, el uso de fitoreguladores sintéticos y los medios de enraizamiento contribuyen al establecimiento axénico y la multiplicación clonal óptimos de plántulas *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* L. Var. "Biloxy").

CAPITULO II

REVISION BIBLIOGRÁFICA

2.1 Antecedentes de la investigación

2.1.1 Desinfección y oxidación de explantes

Toro Cano (2009) uso esquejes de las variedades Bluecrop, Duke y Misty, tras desinfectarlos con etanol al 70% durante 30 segundos, benomilo al 0.1% durante 15 minutos, hipoclorito de sodio al 10% durante 20 minutos. Sembradas en medio de cultivo WPM con 5 mgL⁻¹ de 2-isopentil adenina (2ip), en una cámara de crecimiento a 25 ± 2°C, fotoperiodo de 16 horas de luz. Llegó a la conclusión de que Misty y Duke crecían en cuanto a proliferación de brotes y desarrollo en respuesta a la oscuridad, pero Bluecrop no se veía afectada.

Victoriano Mora (2010) uso tejidos de arándano variedad biloxy sometidos en solución Benlate a 0.2 % por 30 minutos, tratados con cinco dosis de hipoclorito de sodio comercial 6% (20, 30, 40, y 50 % v/v) por 20 minutos, y cultivados en medio WPM. Concluyó que la dosis utilizada de hipoclorito sódico al 30% v/v, permitió obtener el 90 % de explantes sin contaminación fúngica.

Hine Gómez y Abdelnour Esquivel (2013) utilizaron estacas variedad Avonblue, sometidos a cuatro desinfecciones, luego inoculados en medio Murashige & Skoog. Determinaron que la concentración de hipoclorito sódico al 1,5% y 0,1% de Tween 20 durante 40 minutos, obtuvieron el mayor porcentaje de explantes inocuos.

Brenes Angulo, Castillo Matamoros, y Gómez-Alpízar (2014) para la desinfección de las variedades Sharpblue y Woodard, emplearon alcohol de 70%, hipoclorito sódico al 3% con Tween 20. Luego se sembraron en medio MS con 2,0 mgL⁻¹ de N6- Bencilaminopurina (BAP). Determinaron que Sharpblue tenía un 18% y un 11% de explantes seguros sin fenolización, mientras que Woodard tenía un 76% y un 80%, respectivamente.

Lerma Bocanegra, García, Niño Fandiño y Díaz Escobar (2019) estacas variedad Biloxy tratados con Ridomil (2gr/L), sumergidos en soluciones de ácido ascórbico (150 ppm) y ácido cítrico (150 ppm); seguido de fungicida Extran al 0.1% durante 30 minutos, alcohol al 70% por 30 segundos, y 4 concentraciones de NaOCl comercial (1%,2%,3% y 4%). Luego de ser

inoculados en medio WPM, cisteína (5 mg/L), Polivinilpirrolidona (PVP) (100mg/L). Determinaron que con concentraciones de 2% y 3% de NaOCl obtienen bajos porcentajes de contaminación.

Aquije Valiente (2020) utilizó estacas de la variedad Biloxy, lavados con agua y jabón por 10 minutos, sumergidos en fungicida Benomil (1g/L) por 5 minutos, bactericida Phyton 27 (2 ml/L) durante 10 minutos, hipoclorito sódico al 10% por 15 minutos, alcohol al 70% durante 2 minutos. Se sembraron en medio WPM con hormonas. Obtuvieron un 25% de contaminación en su experimento.

2.1.2 Medio de cultivo

Victoriano Mora (2010) en tres trabajos de investigación de arándanos En el primer usó diferentes concentraciones de (BAP), en el segundo empleó tres citocininas: BAP, 2-isopentiladenina (2ip) y Kinetina y el tercero probó el medio WPM con diferentes concentraciones de 2ip y contrastaron medios WPM y WPM modificado. Concluyó que con 2 mg L-1 de BAP alcanzó 45.46 % en crecimiento de brotes y longitud, además de 2ip con 2mg L-1, y WPM modificado mejor medio.

Hine Gómez, y Abdelnour Esquivel (2013) usando estacas inmaduras arándano, se sembraron en medio WPM con tres dosis de 2,5 mg/L de hormonas (2ip, BAP y CPPU), obtuvieron una importante cantidad de brotes con CPPU, con dos brotes por microestaca, con 2ip obtuvieron el mayor número de hojas por brote.

Brenes Angulo, Castillo Matamoros y Gómez-Alpizar (2014) propagaron arándano procedente de partes de hoja *in vitro* y partes de hoja procedente de campo, los cultivares Sharpblue, Woodard, Bonita y Delite. Para promover la emisión de brotes usaron WPM con 1,5 mg. L-1 Thidiazuron obteniendo formación de micromacollas con $44,70 \pm 13,34$. Para promover la longitud de brotes usaron WPM con 0,5 mg/L de hormona zeatina, pero no tuvieron diferencia significativa.

Lerma Bocanegra, García, Niño Fandiño y Díaz Escobar (2019) El estudio determinó el efecto de la zeatina en el desarrollo de brotes de arándanos. Con 1mg/L produjeron mayor cantidad de brotes por tallo, mientras que 2mg/L proporcionó el mayor tamaño de brotes.

Aquije Valiente (2020) usaron explantes de arándano variedad Biloxy, sometidos a 3 tratamientos (testigo sin reguladores, 2ip (2 mg/L), 2ip (2mg/L) y BAP (0,5mg/L)) en medio WPM. Concluyó que los mejores resultados se obtuvieron con WPM sin regulador de crecimiento con 24.47 % en número de nudos.

2.1.3 Multiplicación

Rodríguez Beraud y Morales Ulloa (2015) usando variedades Brigitte y Legacy, sembrados con distintas cantidades de brotes (5, 10, 15, 20 y 25) y diferentes densidades de medio WPM (10, 20, 30 y 40 mL) con 4 mg L⁻¹ de (2ip). Para el crecimiento y desarrollo de nuevos brotes ambas variedades respondieron con 30 ml de volumen del medio con una densidad de 25 explantes.

Castro Fernández (2016) realizó la comparación de dos medios de cultivo WPM y MS 1/3. Además de la citocinina 2ip. En sus resultados sobre la tasa de multiplicación, los brotes obtenidos en medio MS 1/3 mostraron menor tamaño, además de hojas cortas. El uso de 2,5 mg/L de 2ip, obtuvieron brotes grandes vigorosos y hojas de mayor tamaño.

2.1.4 Enraizamiento

Toro Cano (2009) utilizó estacas de la variedad Bluecrop. Los brotes se inocularon durante 30 días en medio WPM sin reguladores, 10 días antes de aclimatar los brotes se agregaron 20 mL de agua destilada estéril sobre el medio. Sus resultados favorecieron mayor sobrevivencia de los brotes aclimatados. Obteniendo raíces de mayor longitud y desarrollo radicular a los 30 días de aclimatación.

Brenes Angulo, Castillo Matamoros, y Gómez-Alpízar (2014) usaron brotes de 8-10 cm de largo, se sembraron en medio WPM con diferentes dosis de AIB (0, 1, 2, 4 y 8 mg/L-1). El porcentaje de formación de raíces fue menor al 10%, en condiciones *in vitro*. Al trasplantarse los brotes en sustrato bajo condiciones de invernadero, el enraizamiento fue de 100%.

Castro Fernández (2016) empleó el uso de dos medios de cultivo WPM y MS al 1/3 suplementado con AIB 1 mg/L y carbón activado 1 mg/L, además de comparar diferentes dosis de AIB (0,1 y 0,5 mg/L). Sus resultados mostraron que el medio MS 1/3 con AIB y Carbón

obtuvo mayor cantidad de raíces, con el uso de 0,5 mg/L de AIB obtuvo 34,38% de desarrollo radicular.

2.2 Bases teóricas

2.2.1 Origen y distribución geográfica del arándano

El arándano es un arbusto endémico de Norteamérica que crece de forma silvestre. Los arándanos se cultivan habitualmente en dos tipos: el arándano de matorral bajo (*Vaccinium angustifolium*), que incluye las especies menores, y el arándano de matorral alto (*Vaccinium corymbosum*), que incluye los arbustos más grandes que contienen variantes comerciales.

Las primeras investigaciones e intentos de instalar cultivos de arándanos tuvieron lugar en el Perú. En el año 2004, se realizó un estudio de zonificación agrícola como parte de un esfuerzo de la Unión Europea para evaluar la ubicación geográfica de posibles zonas productoras de arándanos. Cajamarca y otros departamentos fueron identificados como zonas potenciales que reúnen condiciones como características agro climáticas (temperaturas bajas, humedad al 70%), velocidad del viento, presencia de heladas, fertilidad de suelo, entre otras. Con fines de producción comercial para exportación, utilizando tecnologías productivas para alcanzar cosechas lucrativas y competitivas. (MINAGRI, 2016).

2.2.2 Taxonomía

Cronquist (1981), Retamales & Hancock (2012), mencionan que el arándano, taxonómicamente pertenece a la familia Ericaceae.

Especie: *Vaccinium corymbosum* L. 1753.

2.2.3 Morfología del arándano

Raíz: suele encontrarse entre 25 o 30 cm de profundidad del suelo. Aproximadamente el 80% se encuentran entre 36 y 60 cm del centro de la corona. (Carrera, 2012, como se citó en Maticorena Quispe, 2017). Las raíces carecen de pelos absorbentes. Retamales y Hancock (2012) mencionan que el sistema radicular se divide en dos tipos: raíces gruesas (más de 11

mm de grosor), actuando como almacén de reservas y anclaje al suelo, y raíces filamentosas (1 mm de grosor), que consumen agua y nutrientes.

Hojas: son simples, enteras o dentadas, se disponen de manera alterna a lo largo del tallo. De varias formas como espatulada, elíptica, oblanceolada (Retamales & Hancock, 2012).

Flores: son perfectas y epigínicas, con racimos simples que nacen de yemas laterales. Contiene nectarios cerca de la parte inferior de la floración. Se crea un racimo por nudo, mientras que los brotes más grandes pueden producir dos. (Retamales & Hancock, 2012).

Fruto: es un fruto de color azul oscuro a negro que varía de tamaño según el clima, variedad y las circunstancias de manejo. La pulpa es color verde claro y translúcida. Externamente la baya está recubierta por una capa cerosa de 5 μm de espesor. Madura entre dos a tres meses según el clima y la variedad con temperatura de 20 a 25°C para el desarrollo del fruto y humedad de 70% (Retamales & Hancock, 2012, como se citó en Maticorena Quispe, 2017).

2.2.4 Variedades

Las variedades comerciales de arándano (*V. corymbosum*) se dividen en dos grupos: (1) Arándanos de zona alta, que comprenden variedades con necesidades de más de 100 horas de frío o más. Muchos mejorados para obtener futas de calidad superior y mayor resistencia a temperaturas bajas de 16 - 15 °C ('Berkeley', 'Bluecrop', 'Bluetta', 'Brigitte', 'Duke', 'Elliot', 'Jersey'). (2) Arándanos de zona baja tienen necesidades de horas frío más cortas (500-600), lo que los hace adecuados para el cultivo perenne en zonas tropicales con temperaturas que oscilan entre 20 y 25 °C. ('Biloxy', 'Emerald', 'Jewel', 'Misty', 'O'Neal') (Retamales & Hancock, 2012).

Biloxy (1998 en Mississippi) es el más popular del país, ya que necesita menos de 400-500 horas de frío para prosperar. Este arbusto tiene gran vigor y producción temprana, bayas pequeñas a medianas con una sola cicatriz en el centro, color azul claro, textura firme y un sabor agradable (Retamales y Hancock 2012). No es especialmente resistente a las heladas (Rebolledo, 2013). Fue creada por el Servicio de Investigación Agrícola del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (ARS-USDA). Es un tetraploide formado por el cruce de *V. corymbosum* (que aporta menos del 50 por ciento), *V. angustifolium* Aiton, *V. ashei* Reade y

V. darrowii Camp. Esta última le proporciona tolerancia a heladas, actuando como planta perenne.

2.2.5 Propagación convencional por estacas de arándano

Rodríguez Beraud y Morales Ulloa (2015) sostienen que esta propagación requiere de las siguientes labores:

Colecta de estacas: se utilizan tallos de un año, colectados en dos diferentes tiempos: de julio - agosto (estaca semileñosa sin hojas) y enero - febrero (madera suave y con hojas).

Preparación de sustratos de enraizamiento: en camas para época de baja temperatura se utiliza tierra negra mezclada con perlita en proporción 4:1 y en las camas para época de alta temperatura en proporción 2:1, el riego en este último es frecuente debido a la temperatura alta.

Tratamiento de estacas: los tallos no deben contener yemas florales, sin hojas para disminuir la transpiración. Se cortan en segmentos de 8 cm de longitud, deben tener de 4 a 5 yemas. El corte de la parte superior de la estaca debe ser en bisel para evitar la acumulación de agua, el corte basal se realiza debajo de una yema. Para la desinfección se sumergen en solución de Captan (2 gr/L).

Aplicación de Hormonas enraizantes: facilitan la estimulación de raíces, como son Ácido Indol acético (AIA), Ácido naftaleno acético (ANA) o Ácido Indol butírico (AIB) en altas dosis de 1000 a 4000 ppm.

Enraizamiento de esquejes: se realiza en bandejas que contienen tierra negra con perlita, estas deben estar dentro del invernadero con temperatura de 25 °C y humedad 75%. Las estacas deben ser colocadas a 4 cm de profundidad, además de usar una solución fungicida en el corte apical de la estaca.

2.2.6 Uso de soluciones antioxidantes en el cultivo *in vitro*

La presencia de fenoles en explantes de cultivo *in vitro* limita el establecimiento de los tejidos vegetales de diversas especies de plantas, en particular de plantas leñosas. Este es uno de los

problemas más críticos y comunes que surgen durante el mantenimiento inicial y continuo de un tejido cultivado *in vitro*. (George 1996, como se citó en Tang y Newton 2004).

Este proceso está relacionado con el estrés oxidativo experimentado por las células del explante cultivado. Producido por un desequilibrio entre los procesos de pro-oxidación (creación excesiva de Oxígeno Reactivo - ROS y Oxígeno Nitrosativo - RNS o de tipo enzimático) y los mecanismos de detoxificación antioxidante, resultante de un aumento de radicales libres. (Novoa *et al.* 2001, como se citó en Turrens 2003).

Tanto ROS y RNS oxidan muchos componentes biológicos, provocando la muerte oxidativa de la célula. Estas moléculas (OH) degradan lípidos, polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos, provocando el colapso celular. (Bray *et al.*, 2000, como se citó en Mittler *et al.*, 2004). Tang *et al.* (2004) descubrieron que los niveles elevados de H₂O₂ estaban asociados con la muerte celular en células de *Pinus virginiana*. Tras ser cortados, los explantes desinfectados pierden su color verde y se oscurecen, liberando exudados oscuros en los medios de cultivo, que contienen compuestos fenólicos. (Azofeifa, 2009).

La oxidación de explantes, disminuye con el uso de ápices semi maduros, establecidos *in vitro*, colocados en oscuridad por varios días. Luego se colocan en ambientes con luz artificial baja para evitar la fenolización (George, 1996).

Este problema varía con el tipo de medio de cultivo utilizado, causado por el uso inapropiado de algún nutriente. El pardeamiento puede controlarse diluyendo las concentraciones de N y K, diluyendo las sales en el medio de cultivo con Murashige y Skoog (MS) o utilizando medios de cultivo bajos en sal. (George 1996, como se citó en Cassells y Curry 2001). Así, Anderson (1975) encontró que altos niveles de K en medio MS oscurecían los explantes de *Rhododendron*, pero cuando se disminuía el KNO₃ a la mitad de la concentración normal, no se oscurecían. Según Hohtola (1988), con explantes de *Pinus sylvestris* cultivados en medio MS convencional, el crecimiento fue bueno con la mitad de concentraciones de NH₄NO₃, KNO₃ y CaCl₂, y el doble de concentraciones de KH₂PO₄.

Según George (1996), se ha demostrado que el WPM (Lloyd y McCown 1981, Tabla 2), medio de crecimiento para plantas leñosas, minimiza el oscurecimiento de los explantes en comparación con otros medios alternativos.

Otras alternativas es la incorporación de los ácidos cítricos y ascórbico (soluciones antioxidantes) en el medio o el tratamiento de los explantes en la desinfección de tejidos vegetales. Con concentraciones de 150 mg/L de ácido cítrico y 100 mg/L de ácido ascórbico (Azofeifa, 2009). En explantes de anacarado D'Silva y D'Souza (1993) implementaron un pre tratamiento, sumergiendo los tejidos por una hora, en ácido ascórbico (49,32 mg/L), redujo el oscurecimiento. Cuando se realizó la mezcla de las soluciones de ácido cítrico, ácido ascórbico, y ácido acético (176 mg/L) al momento de la escisión del explante, se logró eliminar el problema.

2.2.7 Medios de cultivos para cultivo *in vitro* de Arándano

2.2.7.1 Medio Murashige & Skoog (1962)

Es el medio más conocido. Apto para una gran variedad de especies, excepto para las más sensibles a la salinidad (George *et al.*, 2008).

Tabla 1

Componentes químicos del medio de cultivo Murashige and Skoog (1962).

Constituyentes			Concentración (mg/L)
Sales	Nitrato de potasio	KNO_3	1900
	Nitrato de Amonio	NH_4NO_3	1650
	Cloruro de calcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
	Sulfato de Magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
	Fosfato acido de potasio	KH_2PO_4	170
	Sulfato de manganeso	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	22.3
	Sulfato de zinc	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
	Ácido bórico	H_3BO_3	6.2
	Yoduro de potasio	KI	0.83
	Molibdato de sodio	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
	Cloruro de cobalto	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
	Sulfato de cobre	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
	Sulfato de Fierro	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
	Na_2EDTA	$\text{Na}_2\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_8\text{N}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.3
Vitaminas	Tiamina HCL	$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{OS} \cdot \text{HCL}$	1
	Mio Inositol	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	100
	Acido nicotínico	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$	0.5
	Piridoxina	$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3$	0.5
	Glicina	$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	2.0
Azúcar	Sucrosa	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	30000
Gelificante	Agar	$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_9$	8000
pH			5.5

Fuente: Castro Fernández (2016)

2.2.7.2 Medio McCown Woody Plant Medium (1981)

Es un medio conocido por su bajo contenido en sal y se utiliza para cultivar plantas leñosas que son perjudiciales en altas concentraciones de sal. (George *et al.*, 2008).

Tabla 2

Componentes químicos del medio McCown Woody Plant Medium (1981).

Constituyentes		Concentración mg/L	
Sales	Nitrato de Amonio	NH_4NO_3	400
	Cloruro de calcio	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	96
	Sulfato de Magnesio	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
	Fosfato acido de potasio	KH_2PO_4	170
	Nitrato de calcio	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	556
	Sulfato de potasio	K_2SO_4	990
	Ácido bórico	H_3BO_3	6.2
	Sulfato de manganeso	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	22.3
	Sulfato de zinc	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
	Molibdato de sodio	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.025
	Sulfato de cobre	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.25
	Sulfato de Fierro	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8
	Na_2EDTA	$\text{Na}_2\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_8\text{N}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.3
Vitaminas	Tiamina HCL	$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{OS} \cdot \text{HCL}$	1
	Mio Inositol	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	100
	Acido nicotínico	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$	0.5
	Piridoxina	$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3$	0.5
	Glicina	$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	2.0
Azúcar	Sucrosa	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	30000
Gelificante	Agar	$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_9$	8000
pH			5.5

Fuente: Castro Fernández (2016).

2.2.8 Reguladores del crecimiento de mayor uso en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales.

Citocininas: promueven la división celular. En dosis elevadas, provocan la producción de brotes adventicios (menor dominancia apical), inhiben la formación de raíces, alta brotación múltiple, ralentizan el envejecimiento celular (Sharry, Adema y Abedini, 2015). Se forman en las zonas de crecimiento como meristemos y puntas de las raíces (ápice). Posteriormente son transportadas de manera acropétala pasando a través de la savia en vasos del xilema (Suárez, 2011, como se referencia en Ramos Amaya, 2012). La citoquinina 2 isopentenyl adenina (2ip), derivada de *Clostridium tumefaciens*, aumenta el desarrollo de los tejidos y la maduración de los cloroplastos.

Auxinas: Favorecen la expansión y alargamiento celular al tiempo que promueven la división celular. Se utilizan junto con las citoquininas durante la fase de multiplicación o solas durante la fase de enraizamiento. Después de ser formadas en los ápices (caulinares y radicales), se transportan polarmente, a través del floema (Sharry, Adema y Abedini, 2015).

El tipo y la cantidad de auxina inyectada juegan un papel crucial en la producción de raíces adventicias porque afectan la extensibilidad celular al crear sustancias que ablandan la pared. Ácido Indolbutírico (IBA) es utilizada debido a su estabilidad; es resistente a la oxidación por la luz, enzimas y otros agentes (Azcón, 2000); y su concentración cambia según la especie utilizada. La cantidad de auxina utilizada vendrá determinada por los niveles endógenos de esta fitohormona en la planta (Sharry, Adema y Abedini, 2015).

2.3 Definición de Términos Básicos

Ácido cítrico: El ácido orgánico tricarbóxico se utiliza como antioxidante para prevenir la oxidación del fenol en tejidos lesionados (Sharry, Adema y Abedini, 2015).

Ácido ascórbico: interviene en el sistema de fenolización de la célula. Por ello, se utiliza como antioxidante para evitar la oxidación de las sustancias fenólicas. (Sharry, Adema y Abedini, 2015).

Antioxidante: Producto químico que impide la fenolización u oxidación de los explantes (Perea, 2009).

Asepsia: Serie de procedimientos para eliminar los gérmenes del material biológico, los instrumentos o el equipo de laboratorio. (Perea, 2009).

Axénico: un cultivo que está totalmente libre de interacción con cualquier otro organismo, ya sea virus, bacteria, micoplasma, hongo u otro organismo similar que pudiera causar su deterioro. (Roca & Mroginski, 1993)

Clon: Individuo generado asexualmente. (Perea, 2009).

Contaminación: modificación de un cultivo por factores químicos, físicos o biológicos (Perea, 2009).

Cultivo de tejidos vegetales: tejidos *in vitro* en crecimiento permite su desarrollo y la conservación en su morfología. (Perea, 2009).

Desinfección: erradicación de gérmenes por medios físicos o químicos (Perea, 2009).

Detoxificar: acción de eliminar toxinas presentes en el proceso de fenolización mediante el uso de antioxidantes (Azofeifa, 2009).

Endógeno: cuando los nuevos tejidos se crean dentro del tallo, dejando los antiguos en el exterior del tallo. (Perea, 2009).

Estaquilla: Componente vegetativo (rama) extraído de una planta y utilizado para crear otra estaca en forma vegetativa. (Rodríguez Beraud y Morales Ulloa, 2015)

Explante: parte de un tejido vegetal se trasplanta a un medio artificial para su desarrollo. (Perea, 2009).

Fitohormona: sustancia química orgánica generada en la planta en pequeñas cantidades; favorece, inhibe o modifica el crecimiento. (Perea, 2009).

Flavonoides: Sustancias químicas fenólicas formadas durante el metabolismo secundario de los vegetales. Tienen propiedades antioxidantes y pueden suprimir los procesos catalíticos de los radicales libres. (Tránsito López, 2002).

Hipoclorito de sodio: (cuya desintegración en el agua se conoce como lejía o cloro). El NaClO es un potente compuesto químico oxidante. Incluye cloro, lo que lo hace útil como desinfectante. (De la Rosa y Figueroa Gerstenmaier, 2020).

Morfogénesis: cambios morfológicos que se producen como resultado de cambios estructurales en el desarrollo de un organismo. (Perea, 2009).

Micropropagación: Las plantas individuales se multiplican rápidamente, lo que permite producir un gran número de plantas con la misma carga genética. (Sharry, Adema y Abedini, 2015).

Organogénesis: el crecimiento *in vitro* de los explantes da lugar a la creación de nuevos órganos (raíces y/o ramas adventicias). (Torrey, 1966).

Oxidación: oscurecimiento del tejido vegetal inducido por radicales libres de diversos componentes celulares, que provoca daños, restricción del crecimiento y, en casos extremos, necrosis y muerte. (Amiot *et al.*, 1996 como se citó en Bray *et al.*, 2000).

Plantas madre: es una planta excepcional elegida por sus rasgos fenotípicos únicos en la micropropagación de tejidos vegetales. (Sharry, Adema y Abedini, 2015).

Plantas leñosas: es una planta excepcional elegida por sus rasgos fenotípicos únicos en la micropropagación de tejidos vegetales. (Ramos Amaya, 2012).

Plántula *in vitro*: planta obtenida como consecuencia de la germinación de una semilla o brotación de una yema en condiciones *in vitro* (Sharry, Adema y Abedini, 2015).

Radical libre: compuesto producido a partir del metabolismo del oxígeno como oxígeno reactivo. Se encuentran en situaciones oxidativas cuando los tejidos están dañados o senescentes, lo que provoca la muerte del tejido. (Azofeifa, 2009).

Uninodales: prefijo que significa uno. Referente a una sola yema o nudo. (UNALPM, 2020)

Vigor: según Pérez García y Pita Villamil (2016), las cualidades de las semillas afectan a su capacidad para crear plántulas sanas con rápidas tasas de desarrollo.

Vitropatógenos: organismos que no son necesariamente nocivos para las plantas en estado silvestre, pero sí para las células, tejidos u órganos cultivados *in vitro* (Sharry, Adema y Abedini, 2015).

Yema axial: yema situado u originado en la axila de las hojas (UNALPM, 2020).

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación geográfica del trabajo de Investigación

El estudio se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cajamarca, la que geográficamente se ubica a 2700 de altitud.

3.1.1 Material Biológico

Plantas de arándano, var. Biloxy, procedencia *in vitro*, (Chile), explantes de yemas axilares asépticamente aisladas, procedentes del vivero “Santa Fe” ubicado en la carretera Cajamarca – Jesús (Km), a 2750 msnm, con temperatura anual de 14.6 °C, humedad 65% y una precipitación anual de 823 mm.

3.1.2 Medios de cultivo

Se utilizaron los medios Murashige & Skoog 1962, al 50% de concentración y el medio McCown Woody Plant Medium 1980, al 100% de concentración. Ambos complementados con 0, 1, 2, 4 y 8 ppm de 2 isopentenyl adenina.

3.1.3 Insumos y materiales de laboratorio

- Agua destilada
- Agar (Merck S.A)
- Azúcar (sacarosa)
- Solución de ácido clorhídrico (1 normal) e hidróxido de sodio (1 normal).

Soluciones de vitaminas:

- Glicina 400 ppm
- Acido nicotínico 200 ppm
- Piridoxina 200 ppm
- Tiamina 200 ppm
- Mio Inositol 1000 ppm

Soluciones de reguladores del crecimiento:

- Ácido Indol Butírico 1000ppm
- 2ip (isopentenyl adenina) 1000 ppm

Material de vidrio:

- Matraces de 300 y 150 ml de volumen
- Vasos de precipitación de 40 ml
- Envases de vidrio de 30 ml de volumen
- Placas de Petri

Equipo de laboratorio:

- Autoclave (H.W Kessel S.A.C)
- Estufa (M.R.C L.T. D)
- Destilador de agua
- Balanza analítica (OHAUS Estándar)
- Calentador- agitador magnético (H.W Kessel S.A.C)
- PH – metro (CIMATEC S.A)
- Refrigeradora (COLDEX)
- Cámara de aclimatación (INTERMATIC INCORPORATED)
- Cámara de flujo laminar (ENVIRCO CORPORATION)

Otros materiales:

- Espátula
- Bagueta de vidrio
- Magneto rotatorio
- Papel aluminio (1 rollo)
- Papel absorbente
- Algodón esterilizado
- Pinzas de 15 cm de largo
- Escalpelo o mango de Bisturí N° 7
- Hojas o escalpelo de Bisturí N° 20
- Mechero de alcohol
- Parafilm
- Cámara digital
- Libreta de apuntes
- Cinta masking
- Plumón tinta indeleble
- Hilo nylon

3.2 Metodología

La micropropagación del arándano, comprendió las siguientes etapas:

Etapas 0: Selección y acondicionamiento de la planta madre.

Las plantas madre de arándano, de 6 meses de edad, se seleccionaron previamente en base a vigor, altura y sanidad. Con el propósito de favorecer su aclimatación y reducir la incidencia de contaminantes, estas plantas fueron colocadas en cámara de termoterapia, con temperatura de 25° C y humedad relativa 61 %, reguladas. Bajo estas condiciones, “las plantas madre” permanecieron por 20 días.

Figura 1

Plantas de arándano procedentes de Vivero "Santa Fe" - Cajamarca.



Figura 2

Plantas seleccionadas para establecimiento in vitro.



3.2.1 Desinfección y prevención de la oxidación de explantes.

Transcurrido los 20 días de aclimatación, se aislaron los tallos y a partir de ellos, los explantes compuestos de una yema axilar. Posteriormente, fueron agrupados para formar 4 tratamientos con 3 repeticiones y 10 unidades experimentales por tratamiento, para ser desinfectados superficialmente:

Tratamiento 1 (t₁): explantes lavados con solución de jabón antibacterial al 1% por 10 minutos, con tres lavados de agua destilada estéril, luego sumergidos en solución hipoclorito de sodio (lejía) al 1.5% y 0.5 ml de Tween 20 por 25 minutos, enjuagados con agua destilada estéril (tres veces). Finalmente, sumergido en alcohol etílico al 70% por un minuto y enjuague con agua destilada estéril (tres veces).

Tratamiento 2 (t₂): explantes lavados con solución de jabón antibacterial al 0.8% durante dos horas, con tres lavados de agua destilada estéril, luego sumergidos en solución de hipoclorito de sodio (lejía) al 2 % y 0.5 ml de Tween 20 por 5 minutos y enjuague con agua destilada estéril, tres veces.

Tratamiento 3 (t₃): lavado de explantes con solución de jabón antibacterial al 1% durante 10 minutos, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril, luego sumergidos en solución de hipoclorito de sodio (lejía) al 1.5%, combinado con 0.5 ml de Tween 20, por 25 minutos y enjuagados con agua destilada estéril, tres veces. Luego tratados en alcohol al 70% por un minuto y tres enjuagues con agua destilada estéril. Finalmente, tratados con soluciones anti oxidantes ácido ascórbico (50 ppm) y ácido cítrico (75 ppm).

Tratamiento 4 (t₄): lavado de explantes con solución de jabón antibacterial al 0.8% durante dos horas, con tres enjuagues de agua destilada estéril, sumergido en solución de hipoclorito de sodio (lejía) al 2 % y 0.5 ml de Tween 20 por 5 minutos y enjuague con agua destilada estéril, tres veces. Finalmente, tratados con soluciones anti oxidantes ácido ascórbico (50 ppm) y ácido cítrico (75 ppm).

Figura 3

Soluciones de desinfectantes para los tratamientos T1 y T3.



Figura 4

Explantos cortados para proceso de desinfección.



Figura 5

Soluciones desinfectantes y antioxidantes: a) Desinfección tratamiento T1 y T3 b) Desinfección tratamiento T2 y T4.

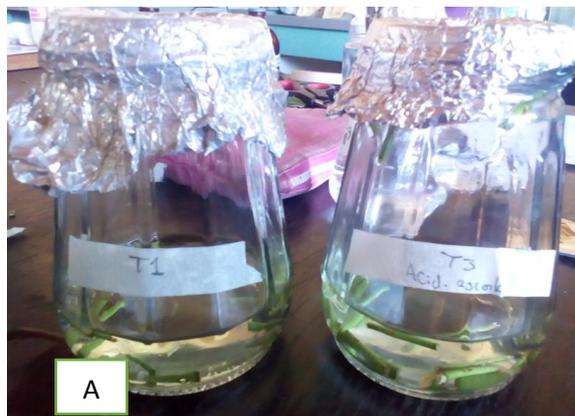
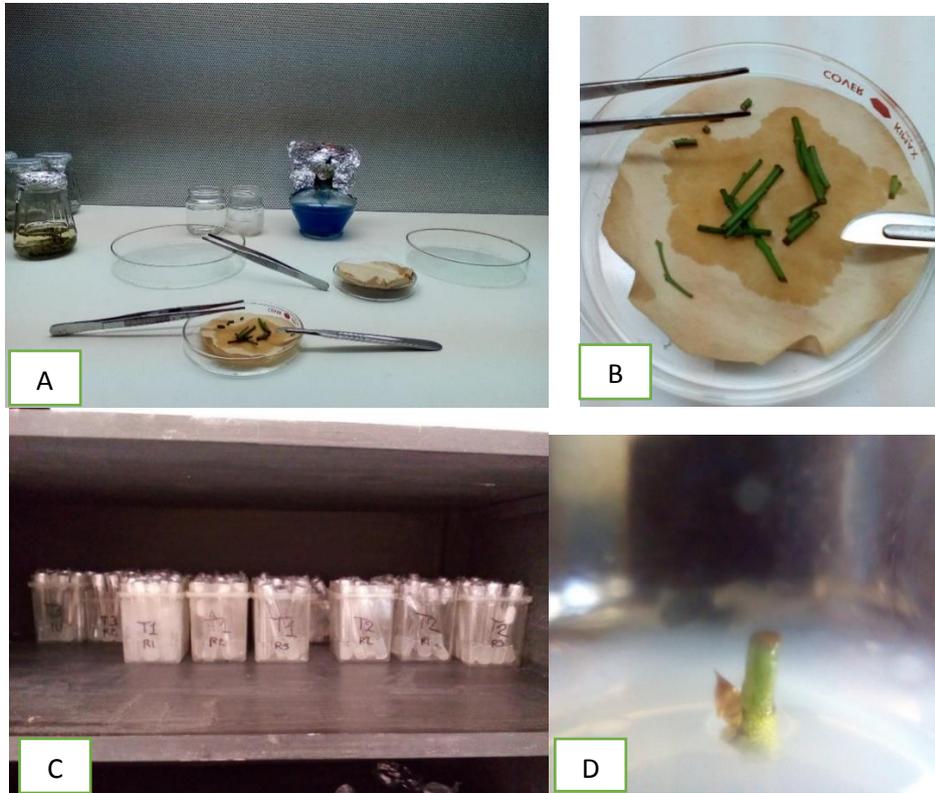


Figura 6

a) *Explantos desinfectados* b) *Corte de yemas axiales de arándano aproximadamente 1cm.* c) *Explantos almacenados en cámara oscura por 15 días.* d) *Explanter recién sembrado dentro de tubos de ensayo.*



Evaluaciones Realizadas

Número y porcentaje de explantes contaminados: con el propósito de evidenciar la presencia de hongos y/o bacterias contaminantes, sobrevivientes al proceso de desinfección de superficie, los 30 explantes de cada tratamiento fueron observados bajo microscopio estereoscópico cada tres días y por un lapso de dos semanas. Ello permitió determinar el número y porcentaje de explantes contaminados, así como el tipo de contaminante presente en las unidades experimentales de cada tratamiento.

Los explantes contaminados y muertos se descartaron, mientras que los sobrevivientes fueron nuevamente incubados en la cámara de crecimiento, bajo las condiciones ambientales previamente descritas (Tabla 32).

3.2.2 Siembra *in vitro*

La cámara de flujo laminar horizontal, fue desinfectada con papel toalla con alcohol al 70 %; luego se colocaron dentro los materiales e instrumentos estériles (pinzas, bisturí, envases con medios de cultivo y placas petri con papel estéril.) además del material vegetal (explantes) para realizar la siembra *in vitro*

Dentro de la cámara de flujo, usando una pinza estéril, se extrajeron uno a uno, los explantes (yemas axilares) contenidos en sus respectivos frascos de vidrio, se colocaron dentro de una placa Petri. Con el uso del bisturí, se cortaron los extremos de los explantes hasta tener una longitud promedio de 0,5 cm, luego la yema axilar, fue introducida en la superficie del medio de cultivo de los tubos de ensayo, según tratamiento le corresponda (Tabla 4).

Figura 7

Realización de cortes a los explantes con segmentos uninodales.



Figura 8

Siembra in vitro en etapa de establecimiento.

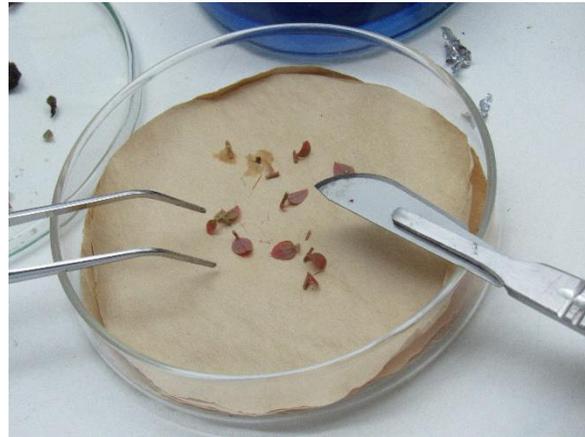


Figura 9

Explante uninodal de arándano recién sembrado.



Incubación de tejidos *in vitro*

Luego de la siembra *in vitro*, los tubos de ensayo fueron sellados, identificados e incubados en una cámara oscura con de 17 °C de temperatura y humedad de 60 %. los cultivos se conservaron por 8 días antes de ser transferidos a la cámara de crecimiento (3000 lux, 12 horas luz, 16 a 20 °C y 70 a 80 % de humedad) hasta la formación de tallos y hojas.

Tabla 3

Tratamientos en estudio para establecimiento in vitro Arándano.

Tratamiento		Medio de cultivo
N°	Clave	Descripción
1	m_1d_0	Woody plant + 0 ppm 2ip
2	m_1d_1	Woody plant + 1 ppm 2ip
3	m_1d_2	Woody plant + 2 ppm 2ip
4	m_1d_3	Woody plant + 4 ppm 2ip
5	m_1d_4	Woody plant + 8 ppm 2ip
6	m_2d_0	Murashige y Skoog + 0 ppm 2ip
7	m_2d_1	Murashige y Skoog + 1 ppm 2ip
8	m_2d_2	Murashige y Skoog + 2 ppm 2ip
9	m_2d_3	Murashige y Skoog + 4 ppm 2ip
10	m_2d_4	Murashige y Skoog + 8 ppm 2ip

Diseño experimental

Se utilizó el diseño Completamente Randomizado (DCR) en arreglo factorial 2x5 (2 tipos de medio de cultivo y 5 dosis de hormona 2ip) con diez tratamientos y tres repeticiones. Cada tratamiento tiene diez unidades experimentales (explantes).

Evaluaciones realizadas

Semanalmente se evaluaron las siguientes observaciones:

Contaminación/muerte de explantes, por efecto de hongos y/o bacterias contaminantes u otras causas como la fenolización.

Altura o longitud de explante, originado de la yema axilar.

Número de hojas presentes en cada brote diferenciado.

3.2.3 Clonaje in vitro

Tuvo como objetivo la propagación del material vegetativo. Las plántulas *in vitro* obtenidas, fueron aseptícamente segmentadas en micro estacas, compuestas de una porción de tallo con 0.5 cm de longitud y una yema axilar en el medio, que posterior fueron subcultivadas en el mejor medio de la siembra *in vitro*.

Figura 10

Explantos obtenidos de la fase anterior a clonar.



Figura 11

Segmentación de una plántula in vitro de arándano.



Figura 12

Explantos segmentados con una yema de una plántula de arándano.



Evaluaciones realizadas

Tasa de multiplicación o número de plántulas obtenidas a partir de un solo explante

3.2.4 Enraizamiento *in vitro*

Transcurrido un ciclo de clonaje, los brotes regenerados, con una longitud comprendida entre 2 y 3 cm, fueron aséptica y cuidadosamente extraídos del medio de cultivo que los contiene para luego ser subcultivados (nuevamente sembrados) en medios de cultivo conteniendo cuatro dosis de ácido-3-indolbutírico (AIB) (Tabla 5) para estimular su enraizamiento.

Tabla 4

Tratamiento en estudio en la fase de enraizamiento.

<i>Tratamiento</i>		
N°	Clave	Descripción
1	mb_0	0 ppm AIB
2	mb_1	0.5 ppm AIB
3	mb_2	1 ppm AIB
4	mb_3	2 ppm AIB

Diseño experimental

Diseño Completamente Randomizado (DCR), con cuatro tratamientos, tres repeticiones y diez unidades experimentales por tratamiento.

Figura 13

Plántulas in vitro seleccionadas de la fase de multiplicación para inocularse en medio de enraizamiento.



Figura 14

Corte de yema apical y callo a plántula de arándano para ser sembrado en medio para enraizamiento.

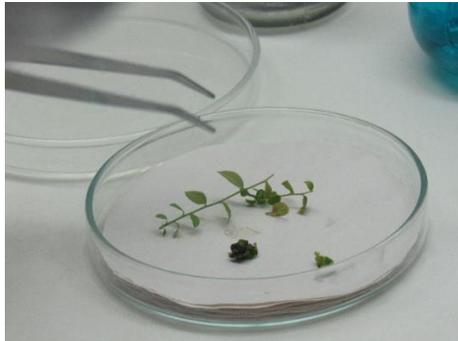


Figura 15

Plántulas in vitro de arándano sembradas en medio para enraizamiento.



Evaluaciones realizadas

Con intervalos de 15 días se evaluó:

Número raíces, longitud o altura de raíz (cm) y finalmente peso fresco y peso seco de los explantes.

3.2.5 Trabajo de gabinete

Procesamiento y análisis de datos

Los datos recogidos durante las evaluaciones fueron ordenados y clasificados en la aplicación Excel. A continuación, se clasificaron y dispusieron de acuerdo con las especificaciones del análisis estadístico que se realizaría. Utilizando la herramienta estadística (INFOSTAT), se realizó la prueba ANOVA (Análisis de Varianza) para ver si existían diferencias significativas entre los tratamientos considerados. De acuerdo con la prueba anterior, la prueba de rango múltiple TUKEY se utiliza para determinar qué tratamientos son los mejores y, por lo tanto, los más recomendados para desarrollar métodos de cultivo *in vitro* de arándanos.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Desinfección y prevención de oxidación de explantes.

4.1.1 Efecto de cuatro soluciones desinfectantes en el control de microorganismos patógenos del cultivo *in vitro* de arándano

Los datos obtenidos para esta etapa (Tabla 5), evidencian que la contaminación por microorganismo y la oxidación enzimática, son dos principales causas de la pérdida de explantes para la obtención de explantes axénicos *in vitro*.

Tabla 5

Número y porcentaje de explantes axénicos por tratamiento.

Tratamiento	Jabón	Alcohol	NaOCl	Ac. Ascórbico	Ac. Cítrico	Nº Explantes no axénicos	Nº Explantes oxidados	Porcentaje de explantes axénicos
1	1%	70%	1,5%			0	11	63,33
2	0,8%		2%			18	2	33,33
3	1%	70%	1,5%	50 ppm	75 ppm	11	3	53,33
4	0,8%		2%	50 ppm	75 ppm	13	3	46,67

Luego de la introducción de micro estacas al sistema *in vitro* y hasta antes del día nueve, no se detectaron explantes no axénicos (contaminados por patógenos), cuando estos fueron superficialmente desinfectados con solución de Jabón al 1%, hipoclorito de sodio al 2% con Tween 20 y alcohol etílico al 70% (t1). Sin embargo, se observaron algunos explantes oxidados cuyo número se mantuvo constante hasta el día 18 (Figura 16). A diferencia de este tratamiento, los demás, presentaron contaminación microbiana a partir del tercer día de instalado el cultivo, la cual aumentó al pasar el tiempo. Hasta el día 18 de la siembra *in vitro*. En todos los casos, los agentes causantes de contaminación fueron hongos una bacteria no identificada. El

porcentaje de explantes axénicos permite determinar que tratamiento es efectivo para obtener explantes libre de patógenos.

4.1.1 Explantes axénicos

Tabla 6

Porcentaje de explantes axénicos.

F.V.	SC	gl	CM	F calculado	F tabular		
					0,01	0,05	p-valor
Porcentaje de explantes axénicos	1533,33	3	511,11	2,02 ns	4,76	9.78	0,0001
Error	1516,67	6	252,78				
Total	3400	11					

C.V.=31.80

ns = no significativo

Nuestros resultados muestran que no hay diferencia significativa entre tratamientos. No obstante el tratamiento 1, tiene una elevada eficiencia en el control de microorganismos contaminantes (hongos y bacterias) de explantes (63.33% de explantes axénicos), resultados comparables con los obtenidos por otros investigadores, como Gómez & Abdelnour – Esquivel (2013), quienes después de aplicar soluciones fungicidas a plantas maduras de arándano, aislaron y desinfectaron brotes maduros con solución de hipoclorito sódico al 1,5% más 0,1% de Tween 20, por 40 minutos y obtuvieron un 85% explantes contaminados al día 18 a diferencia del uso de brotes tiernos con el mismo tratamiento que arrojó un 75% de plantas asépticas. Victoriano Mora (2010), después de sumergir tejidos de arándano, por 30 minutos, en Benlate al 0.2 % y desinfectarlos con hipoclorito de sodio al 6%, obtuvieron el menor porcentaje de contaminación (30 %).

Para Lerma Bocanegra, García, Fandiño y Díaz Escobar (2019), con el uso de 2% y 3% de hipoclorito de sodio además de etanol al 70%, obtuvieron 20% y 15% de contaminación en sus resultados.

Estos resultados confirman la dificultad para el establecimiento axénico de los cultivos *in vitro*, utilizando explantes aislados de material proveniente de campo, aun cuando las plantas madres hayan sido previamente sometidas a un adecuado manejo fitosanitario.

4.1.2 Explantes Contaminados

Hay dos fuentes principales de contaminación en los cultivos *in vitro*. El primero está relacionado con la presencia de microorganismos dentro o fuera de los explantes, mientras que el segundo está asociado con errores en las técnicas de cultivo de laboratorio. (Mroginski, *et al.*, 2010). Los contaminantes más comunes que se encuentran en entornos *in vitro* se denominan "vitropatógenos", que no son necesariamente dañinos para las plantas cultivadas en el campo, pero sí para las células, tejidos u órganos desarrollados en el laboratorio. Estos son responsables de la muerte del tejido porque pueden cambiar el pH, competir por los nutrientes y alterar los medios de cultivo. (Cassells, 2012 como se citó en Sharry, Adema y Abedini, 2015). En efecto, nuestros resultados muestran diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos desinfectantes y su eficacia en el control de microorganismos (Tabla 7).

Tabla 7

Análisis de Varianza (ANVA) para el número de explantes contaminados por tratamiento.

F.V.	SC	gl	CM	F calculado	F tabular		
					0,01	0,05	p-valor
Nº explantas contaminados	10,71	3	3,57	40,01 **	4,07	7,59	0,0001
Error	0,71	8	0,09				
Total	11,42	11					

C.V= 18,69

**= Altamente significativo

Tabla 8

Prueba de Rango múltiple de Tukey al 5% de probabilidad para el número promedio de explantas contaminado por tratamiento. Evaluación realizada a los 18 días de la siembra in vitro.

Tratamiento	Medias	Nivel de significación
T1	0	A
T3	3,67	B
T4	4,33	B
T2	6	B

El tratamiento con 100% de eficiencia desinfectante fue el t1 (solución de jabón al 1% más alcohol etílico al 70%, hipoclorito sódico al 1.5% y 0.5 ml de Tween). A diferencia de este, los otros tratamientos (t3; t4 y t2), el número promedio de explantes contaminados por tratamiento fue de 3.67, 4.33 y 6, de un total de diez, respectivamente (Tabla 8).

4.1.3 Efecto de las soluciones antioxidantes ácido ascórbico y ácido cítrico en el control de la fenolización de tejidos *in vitro* (yema axénica) de arándano.

Otro problema es la oxidación o ennegrecimiento de explantes (Fig. 16), por efecto de los radicales libres de muchos componentes celulares, ocasionando daño, restricción del crecimiento, necrosis y muerte del tejido (Amiot *et al*, 1996, como se citó en Bray *et al.*, 2000).

Figura 16

Vista de mirco tallos oxidados después del proceso de desinfección.



En la presente investigación, los tratamientos desinfectantes que adicionalmente involucraron la presencia de soluciones anti oxidantes, como los ácidos cítrico y ascórbico (t3 y t4), presentaron un menor número promedio de explantes oxidados (uno de diez. A diferencia de estos, en los tratamientos que no incluyeron soluciones anti oxidantes (t1 y t2), pero si, a agentes estresores (hipoclorito de sodio y alcohol etílico, principalmente), el número promedio de explantes oxidados se incrementó a 3.67 y 0.67, respectivamente. El tratamiento 1, corrigió la contaminación microbiana con un 100% de efectividad, sin embargo, indujo la mayor cantidad de explantes oxidados. A pesar de esto, los tratamientos desinfectantes son estadísticamente semejantes en cuanto a sus efectos en la oxidación de los explantes (Tabla 6, Fig. 16), lo que probablemente está asociado a su contenido de agentes estresores. Al respecto, de un lado, Azofeifa (2009), sostiene que, en estos casos, la oxidación está relacionada con el estrés oxidativo y nitrosativo que experimentan las células, liberando fenoles, de otro lado, Van Staden *et al.*, (2006), mencionan que estos factores se definen como compuestos químicos con efectos abrasivos (agentes desinfectantes utilizados en la asepsia de explantes, cambios en el pH del medio y la composición del medio de cultivo) o acción física adversa.

Tabla 9

ANVA para factor Número de explantes oxidados por tratamiento. Datos transformados con $Y = \sqrt{X} + 1$

F.V.	SC	gl	CM	F calculado	F tabular		
					0,01	0,05	p-valor
Nº explantes oxidados	2,97	3	0,99	2,69 ns	4,07	7,59	0,1168
Error	2,94	8	0,37				
Total	5,92						

C.V= 58,15

NS= No significativo

Figura 17

Número promedio de explantes contaminados y oxidados en función al tratamiento en estudio.

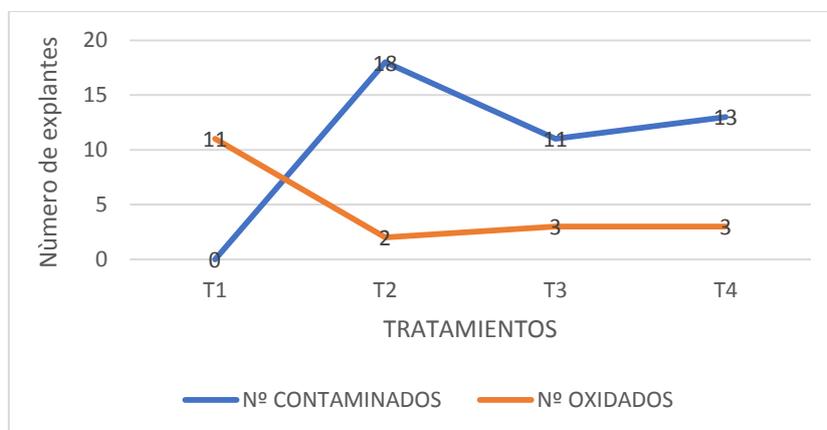
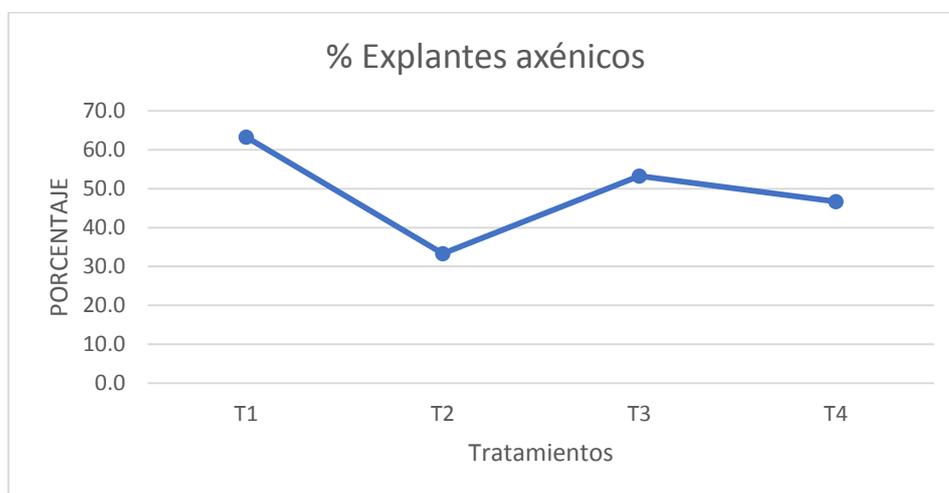


Figura 18

Porcentaje de explantes axénicos del cultivo de arándano en función al tratamiento en estudio.



El mayor porcentaje de explantes axénicos 63.33 % fue registrado en el tratamiento 1, el menor porcentaje de explantes axénicos 33% fue registrado en el tratamiento 2. Valores intermedios fue observado en los tratamientos 3 y 4 (Fig. 17). Se deduce que, el mejor tratamiento para la obtención de explantes axénicos para evitar la contaminación y fenolización es el tratamiento T1, pues previene la contaminación superficial de los explantes, a pesar de inducir el mayor número de explantes oxidados.

4.2 Efecto de dos medios de cultivo Murashige & Skoog 1962 y McCown Woody Plant Medium 1980 y cinco dosis de 2 isopentenil adenina en el establecimiento.

A diferencia de los tratamientos testigo (0 ppm de 2ip, 2-isopenteniladenina) aquellos que involucraron la presencia de citocinina (2ip), iniciaron el brotamiento de las micro estacas a 15 días de instalado el cultivo *in vitro*, momento a partir del cual se evaluaron el número de hojas y de brotes, así como la altura del brote mayor (más alto).

4.2.1 N° Hojas por brote

El ANVA para el efecto del medio de cultivo y las dosis de 2 ip en el número de hojas por tallo, a los 90 días de la siembra *in vitro*, muestra una alta significación estadística para sus efectos simples más no para la interacción de las variables estudiadas (Tabla 10). El valor del coeficiente de variabilidad (CV=25,43 %) muestra una respuesta heterogénea de los explantes frente a los factores empleados en el estudio.

Tabla 10

ANVA para el efecto del medio de cultivo y dosis de 2ip en el número de hojas por brote. Datos obtenidos a los 90 días de evaluación y transformados con: $Y = \sqrt{X} + 1$

F.V.	SC	gl	CM	F calculado	F tabular		p-valor
					0,01	0,05	
MC	3,33	1	3,33	10,47 **	4,35	8,1	0,0041
2ip	28,56	4	7,14	22,44 **	2,87	4,43	<0,0001
MC*2ip	2,57	4	0,64	2,02 ns	2,87	4,43	0,1303
Error	6,36	20	0,32				
Total	40,83	29					

MC: Medio de cultivo; 2ip: 2-isopentenil adenina; NS= No Significativo; CV: 25,43 % **= Altamente significativo.

La Prueba de Tukey al 5% de probabilidad para el efecto de dos medios de cultivo (Murashige y Skoog, 1962, MS al 50% de concentración salina, y Woody Plant Medium, WPM) en el número promedio de hojas por tallo, evidencia que, los brotes con el mayor número promedio de hojas (7,25) se lograron con el medio WPM (Tabla 11). Estos efectos son concordantes con los logrados por Vílchez et al. (2014) al multiplicar micro esquejes de *Psidium guajava*

(guayabo) en medio WPM comparándolo con MS. Adicionalmente, Hine Gómez & Abdelnour Esquivel (2013) y Cüce & Sökmen (2015), reportaron que el uso de WPM permitió mejor crecimiento plántulas muy vigorosas, con grandes hojas a diferencia de aquellas obtenidas en el medio MS 1/3, donde, a su vez, los brotes mostraron menor tamaño y hojas reducidas.

Tabla 11

Prueba de Tukey al 5% para el efecto de dos medios (MS al 50% de concentración salina y WPM) en el número promedio de hojas por brote.

Medio de cultivo		
WPM	7,25	A
MS	5,31	B

Según Ruzic et al. (2012), el medio MS completo es ineficaz para el cultivo de arándanos debido a su escasa tasa de multiplicación y a la alta frecuencia de necrosis de los brotes, fenómenos que no han sido corroborados en nuestra investigación, pues las micro estacas utilizadas únicamente diferenciaron brotes cuando el medio MS al mitad de concentración salina, fue enriquecido con 2 ip, lo que a su vez indica que la diferenciación de brotes es dependiente de la presencia de citocinina en el medio de cultivo.

El tipo de sal y su dosis tienen un efecto directo en la inducción de brotes. El medio MS contiene altas concentraciones de sal. El WPM tiene menos sales minerales que el MS y se suele utilizar para tejidos de plantas leñosas o sensibles a la salinidad (Cardoza, 2008). Además, MS tiene mayor contenido de nitrógeno amoniacal y nítrico KNO₃ que en WPM que contiene Ca (NO₃)₂. El nitrato es más asimilable por parte de la planta, promueve la generación de hojas y nuevos tallos. Según Barwale et al. (1986), los déficits de nitrógeno podrían dificultar la brotación, reducir el número de brotes con tallos delgados y hojas diminutas (Vílchez et al., 2014).

En consistencia con nuestros resultados, en relación WPM es el medio de cultivo más recomendado para arándanos, con la concentración completa de sal, o también duplicando la dosis de nitrato de calcio o usando sequestreno como fuente de hierro (Reed y Abdelnour-Esquivel 1991, como se citó en Fira *et al.*, 2008).

Tabla 12

Prueba de Tukey al 5% para el efecto de dosis de 2ip (2isopentyladenina) en el número de hojas por brote.

2ip	Nº promedio de hojas	Nivel de significación
4	11,17	A
8	8,6	A B
2	6,85	B C
1	4,02	C D
0	0,77	D

El número de hojas por brote, está condicionado por concentración de 2ip, siendo 4 ppm la dosis de 2ip que permitió la mejor respuesta numérica (11,17 brotes) superando a las demás concentraciones de esta citocinina (Tabla 12).

Los datos experimentales sugieren que el meristemo de la raíz es la fuente primaria de síntesis de citoquininas, estas son transportadas desde allí a los brotes y este tipo de citoquinina representa sólo un pequeño porcentaje de la producida por la raíz (Taiz y Zeiger, 2008). Según George (2008), la baja concentración de citoquininas en el brote es insuficiente para sostener el crecimiento *in vitro*; por lo tanto, se requiere la adición de reguladores del crecimiento.

Hine Gómez y Abdelnour Esquivel (2013) proponen que utilizando 2ip a 2,5 mg/L se obtienen brotes más largos y más hojas que con otras citoquininas. Del mismo modo, Castro Fernández (2015) afirma que a 4 mg/L de 2ip se forman brotes etiolados, mientras que a 2,5 mg/L hay menos brotes, pero son más grandes y robustos, con hojas más grandes. Sin embargo, esto contradice nuestros resultados, ya que utilizando 4 mg/L de 2ip se obtuvo un resultado superior (más hojas por brote).

Debnath y McRae (2001) observaron una excelente proliferación *in vitro* de *Vaccinium macrocarpon* cuando los explantes se cultivaron en un medio que contenía 2,5 - 5,0 mg/L de 2ip. También descubrieron que dosis muy altas de 2ip incrementaban la formación de callos, lo que resultaba en brotes con menos hojas y menor vigor. Estudios realizados en Chile encontraron que la dosis óptima de 2ip oscila entre 5 y 10 mg/L, dependiendo de la especie (Muñoz, 1991). Toro Cano (2009), recomienda para el cultivo *in vitro* de plantas semi leñosas,

el medio WPM con 5 mg/L de 2isopentil-adenina (2ip) con un pH de 5,3 y exposición de los cultivos a la luz y oscuridad, metodología que les permitió obtener un buen desarrollo y proliferación de brotes. Victoriano Mora (2010), calificó a la 2ip como la mejor citocinina para el cultivo *in vitro* de arándano. Este autor remarca que la dosis 2mg/L de 2ip, más 0.5 mg/L de ANA le ha permitido obtener los brotes *in vitro* más largos (4cm). Mientras que Aquije Valiente (2020), obtuvo buenos resultados al usar medio WPM sin reguladores de crecimiento en el número de nudos 24,47 al día 80 de ser sembrado.

4.2.2 N° Tallos

El análisis de varianza para el número de tallos (Tabla 13) determina diferencias estadísticamente significativas en los efectos de las variables medio de cultivo, dosis 2ip y su interacción en el número promedio de brotes por tallo (micro estaca). El coeficiente de variabilidad (CV=17,5%) demuestra la variedad de las variables consideradas.

Tabla 13

ANVA para los efectos del medio de cultivo y las dosis de 2 ip en el número de brotes por explante (micro tallo). Datos registrados a los 90 días de evaluación y transformados $Y=\sqrt{X+1}$.

F.V.	SC	gl	CM	F calculado	F tabular		
					0,01	0,005	p-valor
Medio de cultivo	0,5	1	0,5	23,84 **	4,35	8,1	0,0001
2ip	2,76	4	0,69	33,1**	2,87	4,43	<0,0001
Medio de cultivo*2ip	0,56	4	0,14	6,69**	2,87	4,43	0,0014
Error	0,42	20	0,02				
Total	4,23	29					

CV: 17,05 %

**= Altamente significativo

El medio de cultivo de mejor efecto en la diferenciación de la mayor cantidad de brotes por explante fue el WPM (0.94 brotes por explante), lo que ha significado un 35% más de brotes en comparación con los formados a partir de los explantes cultivados en el medio MS (Tabla 13). Independientemente de la composición del medio de cultivo, la incorporación de 2, 4 y 8 ppm de 2 ip en el medio, tuvieron efectos estadísticamente semejantes, pero superiores a los

inducidos por el tratamiento testigo (0 ppm de 2 ip) y aquel con 1 ppm de 2 ip. En base a estos resultados y desde un punto de vista económico resulta recomendable cultivar micro estacas de arándano en medio WPM complementado con 2 ppm de 2 ip, pues con él se logró multiplicar por 4.2 el número promedio de brotes obtenidos con el tratamiento testigo (Tala 14).

Tabla 14

Prueba de Tukey al 5% para el efecto del medio de cultivo en el número de brotes por explante (micro tallo).

Medio de cultivo	Medias	
WPM	0,94	A
MS	0,7	B

Tabla 15

Prueba de Tukey al 5% para el efecto de las dosis de 2ip en el número de brotes por explante (micro estaca).

2ip	Medias	
4	1,25	A
8	1,17	A
2	0,97	A
1	0,48	B
0	0,23	B

La Prueba de Tukey al 5 % de probabilidad para el efecto de relación medio de cultivo y dosis de 2ip en el número promedio de brotes por explante (micro estaca) (Tabla 16), no ha permitido establecer una diferencia estadística lo suficientemente clara como para determinar el mejor tratamiento para conseguir la mayor cantidad de brotes por explante.

Tabla 16

prueba de Tukey con 5% para determinar la influencia de la interacción entre el medio de crecimiento y la dosis de 2ip en el número medio de brotes por explanta (microestaca).

Medio de cultivo	2ip	Medias					
MS	4	1,27	A				
WPM	4	1,23	A	B			
WPM	8	1,23	A	B			
MS	8	1,1	A	B			
WPM	2	1,03	A	B			
MS	2	0,9	A	B	C		
WPM	1	0,73		B	C	D	
WPM	0	0,47			C	D	E
MS	1	0,23				D	E
MS	0	0					E

El número de tallos por brote *in vitro*, es influenciado por concentración de hormona 2ip. Siendo la concentración 4 ppm la dosis que permitió la mejor respuesta numérica 1,25 tallos por plántulas superando a la concentración 8 ppm (1,17 tallos por plántula) y 2 ppm (0,97 tallos por plántula).

La ausencia de 2ip en los medios MS (Murashige & Skoog) y WPM (Woody Plant Medium), no ha limitado ni menos anuló el proceso de formación de brotes adventicios generados de las micro estacas de arándano, quedando así demostrado la presencia de citocinina endógena en el explanta, bajo cuya acción, en promedio, se han formado 0,23 brotes por explante. A diferencia de esto, conforme se incrementa la dosis de 2 ip (citocinina exógena) a 1, 2, 4 y 8 ppm, se incrementa progresivamente la cantidad de brotes por explante a 0,48, 0,97, 1,17 y 1,25, respectivamente. Estos pequeños incrementos representan el impacto complementario de un suministro externo de 2 ip en los dos medios de cultivo distintos. El aumento de la dosis de 2 ip (8 ppm) no aumento la cantidad de brotes por explante.

Hine Gómez (2013) consiguió mayor cantidad de brotes por brote con CPPU cuando utilizó 2 mg/L, promueve la generación de brotes; sin embargo, estos no se alargan, por lo que es necesario transferirlos a otro medio con otra hormona (Brissette et al., 1990; George, 2008). Así pues, los brotes pueden subcultivarse en 2ip, que logró mas longitud de los brotes.

4.2.3 Longitud o Altura de brote

ANVA para el efecto del medio de cultivo y las dosis de 2ip en el número de brotes por explante (Tabla 17), muestra alto valor para el efecto del medio de cultivo y las dosis de 2ip, pero no su interacción, en la longitud promedio de brotes por explante. El coeficiente de variabilidad (CV=25,88 %) indica la variabilidad de los datos estudiados.

Tabla 17

ANVA para el efecto del medio de cultivo y las dosis de 2 ip en la longitud promedio de brotes por explanta. Datos registrados a los 90 días de evaluación y transformados con $Y=\sqrt{X+1}$

F.V.	SC	gl	CM	F calculado	F tabular		
					0,01	0,05	p-valor
Medio de cultivo	1,23	1	1,23	25,93**	4,35	8,1	0,0001
2ip	3,65	4	0,91	19,26**	2,87	4,43	<0,0001
Medio de cultivo*2ip	0,19	4	0,05	1 ns	2,87	4,43	0,4301
Error	0,95	20	0,05				
Total	6,01	29					

CV: 25,88 %

NS= No Significativo

**= Altamente significativo

Tabla 18

Prueba de Tukey al 5% para el efecto de los medios MS y WPM en la longitud promedio de brotes por explante.

Medio de cultivo	Medias	
WPM	1,21	A
MS	0,61	B

Los brotes con la mayor longitud promedio (1.21 mm) fueron obtenidos en el medio WPM. En este medio, los brotes registraron el doble de longitud comparado con los obtenidos en el medio MS, hecho que podría estar relacionado con la respuesta favorable del genotipo a las características nutricionales del medio de cultivo. Resultados similares han sido reportados por Toro Cano, M (2009), quien determinó que el WPM complementado con 0,5 mg/L de Zeatina fue el mejor. Los brotes generados a partir de *in vitro* hojas, miden más de 2 mm y la longitud del brote más largo varió según el cultivar: 3,90 cm en la variedad Woodard; 2,30 cm en Delite y 4,60 cm en Bonita.

Tabla 19

Prueba de Tukey al 5% para la eficacia de la dosis de 2 ip en la longitud promedio de brotes por explante.

2ip	Medias		
4	1,72	A	
8	1,06	A	B
2	1,02	B	
1	0,59	B	C
0	0,17	C	

Los brotes *in vitro* de arándano con la mayor longitud promedio fueron obtenidos con 4 ppm de 2ip (1.72 cm) dosis superiores (8 ppm) o inferiores a ésta, afectan negativamente al crecimiento de los brotes (Tabla 19). Al respecto, Debnath y McRae (2001) descubrieron que dosis muy altas de 2ip aumentaban la formación de callos, daban lugar a brotes con menos hojas y tenían poco vigor.

Dosis de 2ip cercanas a la antes descrita en la presente investigación, también resultaron ser las más favorables para otros investigadores; así por ejemplo, para Victoriano Mora, H (2010), la mejor citocinina fue 2ip con 2 ppm con 0.5 ppm de ANA, combinación que le permitió obtener los brotes más largos (4cm), mientras que Hine Gómez y Abdelnour Esquivel (2013) descubrieron que 2,5 ppm de 2ip producían los brotes nuevos más largos (1,61 cm) y el mayor cantidad de hojas por brote.

Castro Fernández, (2016), con dosis de 2,5 ppm de 2ip obtuvo 3,27 cm de longitud de brotes, mientras que con 4 ppm (2,93 cm) en medio WPM. En medio MS con dosis 4 ppm de 2ip obtuvo 2,62 cm de longitud de brote.

4.3 Efecto de 2 isopentenyl adenina en la multiplicación o clonal *in vitro* de arándano.

Los brotes obtenidos en el establecimiento, fueron clasificados en función a su vigor (Débil, vigoroso y muy vigoroso) (Tabla 20). Luego los brotes clasificados fueron empleados como fuente de explantes (micro estacas de 1 cm de largo y una yema axial), se cultivaron medio de cultivo de mayor eficiencia en la etapa de establecimiento (WPM, Woody Plant Medium 1981, complementado con 4 ppm de 2 ip). Noventa días después de la multiplicación *in vitro*, se obtuvo la tasa de multiplicación, considerando el número total de microestacas obtenidas por cada explanta cultivado.

Tabla 20

Clasificación de los tallos obtenidos en el establecimiento en función a su vigor.

VIGOR GRADO	DESCRIPCION
1	Débil: Brote de 1 a 1,9 cm de largo, con hojas verde amarillentas de 0,1 a 0,3 mm de ancho mayor.
2	Vigoroso: Brote 2 a 3 cm de largo con hojas de color verde y pigmentación roja en sus ápices, de 0,31 a 0.49 mm de ancho mayor.
3	Muy Vigoroso: Brote de 3 cm a 5 cm de largo con hojas de color verde intenso de 0,5 a 0,7 mm de ancho mayor.

4.3.1 Tasa de Multiplicación

El ANVA para la tasa de multiplicación, a los 90 días de la siembra *in vitro*, muestra una alta significación estadística para el efecto del vigor del brote en la tasa de multiplicación *in vitro* del arándano (Tabla 21). El coeficiente de variabilidad (CV=11,36 %) indica la variedad de las variables.

Tabla 21

ANVA para el efecto del tipo de vigor en el brote de la tasa de multiplicación in vitro. Datos registrados a los 90 días de la siembra in vitro y transformados con: $Y=\sqrt{X+1}$

F.V.	SC	gl	CM	F calculado	F tabular		
					0,01	0,05	p-valor
Vigor	22,69	2	11,35	36,97 **	5,14	10,92	0,0003
Error	1,84	6	0,1				
Total	24,54	8					

C.V= 11,36%

**= Altamente significativo

Tabla 22

Prueba de Tukey al 5% sobre la influencia de los grados de vigor sobre el número promedio de explantes multiplicados para determinar la tasa de multiplicación en las plántulas in vitro.

Vigor	Medias	
V3	6,88	A
V2	4,75	B
V1	3	C

La mayor tasa de multiplicación (1: 6.88) se obtuvo con las microestacas aisladas de los brotes de vigor 3 (muy vigorosos) (Tabla 22), los que a su vez fueron regenerados en el medio de cultivo WP complementado con 4 ppm de 2ip. Hine-Gómez & Abdelnour-Esquivel (2013) sostienen que el uso de 2ip genera brotes más largos y más cantidad de hojas. Coincidentemente, Rodríguez y Morales (2015) obtuvieron buenos resultados con 4 mg de 2ip de las variedades Brigitte, Legacy de arándano, con un volumen de medio de 30 y 40 ml de medio, alcanzando más de 40 tallos por envase. Sin embargo, nuestros resultados son diferentes a Castro Fernández (2016), a concentraciones más bajas de 2ip (2,5 ppm), se forman menos brotes, más grandes y robustos, con hojas más grandes, lo que ayuda a su adaptación a las condiciones del invernadero.

4.4 Efecto de cuatro dosis de AIB para el enraizamiento *in vitro* de plántulas de arándano.

4.4.1 Porcentaje de formación de raíces

Los datos logrados para la obtención de la generación de raíces en los brotes de arándano *in vitro*, según Tabla 23, resultó efectivo al momento de crear condiciones para que desarrollen raíces. Obteniendo un 96.67 % al usar medio WPM con la hormona AIB (1ppm), a diferencia de las dosis 2 y 0,5 ppm (76.7% y 66,7%) menor formación de raíces. Para Brenes Angulo, Castillo Matamoros, y Gómez-Alpízar, (2014) usaron brotes de 8-10 cm de largo, lo subcultivaron en medio WPM con diferentes concentraciones de Ácido indol butírico. Obteniendo un 10%, de enraizamiento, independiente de la concentración de AIB. Sin embargo, al trasplantar los brotes a sustrato en invernadero, su enraizamiento fue de 100%.

Asi mismo, Toro Cano (2009) inoculo brotes en medio WPM en ausencia de reguladores, posterior se agregó 20 ml de agua estéril en el medio, diez días antes de aclimatar. Obteniendo un mayor desarrollo radicular a los 30 días.

Lo que comprueba que nuestros resultados son efectivos para la formación de raíces *in vitro* de arándano.

Tabla 23

Porcentaje de enraizamiento in vitro en plántulas de arándano según su tratamiento en estudio.

Enraizamiento <i>in vitro</i> de plántulas de arándano					
Tratamiento	N° sembrados	Brotes	N° brotes con raíz	N° brotes sin raíz	% de Enraizamiento
T1	30		18	12	60
T2	30		20	10	66.7
T3	30		29	1	96.7
T4	30		23	7	76.7

4.4.2 Longitud de raíz

La longitud promedio de la raíz del arándano en *in vitro* es una variable estadísticamente influenciada por la concentración de ácido indol butírico incorporada al medio de cultivo (Tabla 24).

Tabla 24

ANVA para el efecto de cuatro diferentes concentraciones de AIB en la longitud (cm) promedio de raíz. Datos transformados $Y=\sqrt{X+1}$

F.V.	SC	gl	CM	F calculado	F tabular		p-valor
					0,01	0,05	
AIB	0,57	3	0,19	14,04**	4,07	7,59	0,0015
Error	0,11	8	0,01				
Total	0,67	11					

C.V= 13,10 % **= Altamente significativo

Las raíces con mayor longitud promedio (1,34 cm) se obtuvieron bajo el efecto de 1 ppm de AIB (Tabla 25), este fitorregulador sintético, estable, resistente a la oxidación por luz, enzimas u otros agentes (Azcón, 2000), regula el desarrollo, la división celular y generación de raíces en cultivos *in vitro* (Krikorian, 1996). En este proceso regulatorio de orden fisiológico resulta ser importante no solo la adición de auxinas al medio de cultivo (auxina exógena), sino también el contenido de auxina natural del tejido vegetal (auxina endógena) y la interacción que establece la auxina endógena y exógena con otros compuestos hormonales, como las citocininas y giberelinas, entre otros. En este sentido, Rost *et al.*, (1998), cree que una relación alta de citoquinina/auxina crea tallos, mientras que una relación baja de citoquinina/auxina desarrolla raíces. Añade además que cuando dos hormonas están presentes en cantidades iguales, las células forman callos. En consecuencia, el fenómeno observado en la presente investigación, refleja el efecto de una baja relación citocinina/auxina en el sistema *in vitro* compuesto no solo por las hormonas del explante (hormonas endógenas) sino también por las presentes en el medio de cultivo (hormonas exógenas), pues conforme lo remarca Öpik and Rolfe (2005), si en la relación predomina la auxina, hay desarrollo de raíces adventicias. En suma, el tipo y cantidad de auxina aplicada para favorecer la formación de raíces adventicias porque mejoran la extensibilidad celular (Azcón, 2000).

Tabla 25

Prueba de Tukey al 5% sobre la influencia de las 4 dosis de AIB en la variable longitud promedio de raíz por plántula.

AIB	Medias			
1	1,34	A		
2	0,92	A	B	
0,5	0,79		B	C
0	0,32			C

Por su parte, Castro Fernández (2015), incrementó el porcentaje de enraizamiento *in vitro* de arándano utilizando el medio MS complementado con AIB y Carbón activado, pero obtuvo buenos resultados con el medio WPM, sin reguladores de crecimiento. El mismo autor reporta que, agregar 12 ml de dos soluciones de AIB (0,1mg/L y 0,5 mg/L) a explantes que tenían dos meses en medio WPM, empobrecido, le permitió obtener 12,50 y 34,38% de brotes enraizados; pero al pasar estos brotes a sustrato (*ex vitro*), dentro de cámaras de aclimatación, obtuvieron un 80% de formación de raíces.

4.4.3 Número de Raíces

Tabla 26

ANVA para el efecto de dosis de AIB en el número de raíces. Datos transformados $Y=\sqrt{X+1}$.

F.V.	SC	GL	CM	F calculado	F tabular		p-valor
					0,01	0,05	
AIB	0,34	3	0,11	5,43*	4,07	7,59	0,0249
Error	0,17	8	0,02				
Total	0,51	11					

C.V= 9,6%

*= Significativo

El promedio más alto (3,17 raíces por micro estaca) se obtuvo con 1 ppm de AIB (Tabla 27), sin embargo, en ausencia de este fitorregulador exógeno, también se formaron raíces adventicias (1,83 raíces por micro estaca), dejando en claro que éstas fueron formadas por acción de la auxina endógena del explanta.

Tabla 27

Prueba de Tukey al 5 % para el efecto de AIB en el número de raíces por micro estaca.

AIB	Medias		
1	3,17	A	
2	2,27	A	B
0,5	1,97		B
0	1,83		B

Los resultados muestran que esta respuesta morfogénica resulta de la interacción de las fitohormonas endógenas, a nivel celular; habiéndose requerido de una relación alta de auxina/citoquinina para dar como resultado la emisión de raíces adventicias.

4.4.4 Peso Fresco y seco de las plántulas *in vitro* de arándano.

El AIB fitorregulador auxínico que luego de agregarse en el medio de cultivo, tiene un efecto estadístico de alta significación en el peso fresco promedio de plántulas *in vitro* (Tabla 29); sin embargo, no se ha encontrado diferencias entre las dosis empleadas en la presente investigación (Tabla 28). Por lo tanto, resulta económica y técnicamente recomendable emplear la concentración más baja (0.5 ppm) para inducir la diferenciación de plántulas *in vitro* de elevado peso fresco promedio, variable que, a su vez, guarda relación directa con el correspondiente peso seco promedio (Tablas 29 y 30).

Tabla 28

Pesos fresco y seco de las plántulas in vitro de arándano, datos registrados a los 71 días del enraizamiento in vitro.

Tratamiento	Peso Fresco mg	Peso Seco mg
T1	30	3
T1	50	5
T1	100	10
T1	80	10
T2	190	10
T2	230	20
T2	150	20
T2	150	20
T3	190	30
T3	250	30
T3	200	40
T3	130	20
T4	210	30
T4	180	20
T4	200	30
T4	210	40

Tabla 29

ANVA para el efecto de dosis de AIB en el peso fresco de las plántulas in vitro de arándano. Datos registrados a los 40 días de la siembra in vitro y transformados $Y=\sqrt{X+I}$.

F.V.	SC	gl	CM	F calculado	F tabular		p-valor
					0,01	0,05	
Peso							
Fresco	105,18	3	35,06	14,7**	3,49	5,95	0,0003
Error	28,63	12	2,39				
Total	133,81	15					

C.V= 12,57

**= Altamente significativo

Tabla 30

Prueba de Tukey al 5 % para el efecto de la dosis de AIB en el peso fresco las plántulas in vitro de arándano.

AIB	Medias	
2	200	A
1	192,5	A
0,5	180	A
0	65	B

Sánchez Calvo y Alvarenga Venutolo, (2014). Utilizaron diferentes tratamientos para establecer callogenesis (generación de brotes nuevos a partir de callos) y cultivo de células en *Uncaria tomentosa*, usando 2 mg/L de auxina 2,4D y 1 mg/L de auxina AIB, generando mayor cantidad de biomasa seca (0,13g) y mayor peso fresco (2,15 mg), la presencia de 2,4-D en mayor concentración indujo la mayor tasa de división celular.

Tabla 31

ANVA para efecto de la dosis de AIB en el peso seco de las plántulas in vitro de arándano.

Datos registrados a los 60 días de instalado el cultivo y transformados con $Y=\sqrt{X+1}$

F.V.	SC	gl	CM	F calculado	F tabular		p-valor
					0,01	0,05	
Peso							
Seco	22,24	3	7,41	14,27**	3,49	5,95	0,0003
Error	6,23	12	0,52				
Total	28,47	15					

C.V = 16,39

**= Altamente significativo

Tabla 32

Prueba de Tukey al 5 % para el efecto de la dosis de AIB en el peso seco promedio de las plántulas in vitro de arándano.

AIB	Medias	
2	30	A
1	30	A
0,5	17,5	A
0	7	B

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Como resultado del estudio se llegaron a los siguientes resultados:

1. Para el efecto de cuatro soluciones desinfectantes en el control de microorganismos patógenos del cultivo *in vitro* de arándano, se determina que el mejor tratamiento es el tratamiento T1 (Jabón 1%, alcohol 70%, lejía al 1,5 % y 0,5 ml de Tween) para la obtención de explantes axénicos 66.6%.
2. Para el efecto de las soluciones antioxidantes ácido ascórbico y ácido cítrico en el control de fenolización de tejidos *in vitro* (yema axénica) de arándano, se determina que el mejor tratamiento T1 (Jabón 1%, alcohol 70%, lejía al 1,5 % y 0,5 ml de Tween) a pesar de presentar algunos explantes oxidados para la obtención de porcentaje de explantes axénicos 66.6%.
3. Para el efecto de evaluación de dos medios de cultivo Murashige & Skoog 1962 y McCown Woody Plant Medium 1980 y cinco dosis de 2 isopentenyl adenina para el establecimiento *in vitro* de arándano, se determinó que el T4 que consistió en el uso del medio WPM (Woody Plant Medium) y la dosis de hormona 4ppm de 2ip (2isopentyladenina) tuvieron una alta significación en el número de hojas (11, 17), número de tallos (1,25), Longitud de brote (1,72 cm). Para la multiplicación o clonal *in vitro* de arándano, con el uso de la hormona 2ip, con 4 ppm del grado de vigor 3 brote muy vigoroso de 3 cm a 5 cm de longitud con hojas de color verde intenso de 0,5 a 0,7 mm de ancho mayor, generó la mayor tasa de multiplicación de 6, 88 número de brotes por explante.
4. Para el efecto de cuatro dosis de AIB para el formación de raíces *in vitro* de plántulas de arándano, se determinó que la hormona AIB con la dosis 1 ppm en medio WPM, promovieron una mejor emisión de raíz con un porcentaje de 96%, además de las variables longitud de raíz (1,34 cm), número de raíces (3,17), en cuanto al peso fresco y seco tiene un efecto significativo la Dosis (0.5, 1,2) de AIB, por lo contrario en ausencia de esta hormona hay un bajo peso fresco y seco de los explantes evaluados.

CAPITULO VI

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aquije Valiente, J.P. (2020). *Establecimiento in vitro de arándano (Vaccinium corymbosum L.)* (Tesis de grado, Universidad de Zamorano, Honduras).
- Azofeifa, A. (2009). *Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro*. Agronomía mesoamericana. p 24.
- Brenes Angulo, A; Castillo Matamoros, R E; Gómez Alpízar, L. (2015). *Micropropagación de cuatro cultivares de arándano (Vaccinium spp.) a partir de segmentos foliares de dos procedencias*. Agronomía Costarricense, 39(1): 7-23.
- Castro Fernández, A.M. (2016). *Mejora de la propagación de Vaccinium corymbosum L. y evaluación de la actividad en arándanos comerciales*. España.
- Cüce, M. & Sökmen, A. (2015). *Micropropagación de Vaccinium myrtillus L. (arándano) que crece naturalmente en Turquía*. Revista Turca de Biología.
- Debnath, S. (2009). *Propagación y cultivos de especies frutos pequeños conocidos de Vaccinium*. Revista letona de Agronomía, pp. 22-29.
- García-Rubio, J.C.; García, G. (2007). *Orientaciones para el cultivo de arándano*. El cultivo de arándano en Asturias. MAPA. España. p 11-24.
- González, M., López, M., Valdés, A. & Ordas, R. (2000). *Micropropagación de tres especies de bayas utilizando segmentos nodales de plantas cultivadas en campo*. Anales de Biología aplicada, pp. 73-78.
- Gragurevich Pazos, G. (2017). *La red globe de los arándanos*. Red Agrícola. Recuperado en <http://www.redagricola.pe/biloxi-la-red-globe-los-arandanos/>
- Guevara Cruzado, M.E. (2017). *Efecto del estado de madurez, temperatura y tiempo de almacenamiento en la calidad fisicoquímica del fruto del pushgay (Vaccinium floribundum H.B.K.)*. (Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Cajamarca). <https://repositorio.unc.edu.pe/handle/20.500.14074/1692>

- Hine-Gómez, A. & Abdelnour-Esquivel, A. (2013). *Establecimiento in vitro de arándano (Vaccinium corymbosum L.)*. Tecnología en Marcha. Cartago - Costa Rica. p. 64-71. https://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/1584
- Lerma Bocanegra, S.L, García, D; Niño Fandiño, W. y Díaz Escobar Walter. (2019). *Propagación in vitro de arándano (Vaccinium corymbosum L.) a partir de yemas axilares*. Centro de Biotecnología Agropecuaria.
- MINAGRI (2016). *El arándano en el Perú y el mundo producción comercio y perspectivas*. Lima - Perú. p 20-22. Recuperado en <http://arandano%20web/estudio-arandano-2016.pdf>
- Mora, H. V. (2010). *Organogénesis in vitro de arándano Vaccinium corymbosum L.* Tesis de Maestría: Instituto Politécnico Nacional, Michoacán. 50 p.
- M Roca, W. y Mroginski, L.A. (1993). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT-Colombia).
- Ostrolucká, M. G., Libiaková, G., Ondrusková, E. & Gajdosová, A. (2004). *Propagación in vitro de especies de Vaccinium*. Acta Universitatis Latviensis. Recuperado en <http://eeb.lu.lv/EEB/2004/Ostrolucka.pdf>
- Rache, L. Y. & Pacheco, J. C. (2010). *Propagación in vitro de plantas adultas de Vaccinium meridionale (familia Ericaceae)*. Acta Botanica Brasilica.
- Reed, B. M. & Abdelnour-Esquivel, A. (1991). *Uso de zeatina para iniciar cultivos in vitro de especies y cultivares Vaccinium*. HortScience. <http://hortsci.ashspublications.org/content/26/10/1320.abstract>.
- Rodríguez Beraud, M. y Morales Ulloa, D. (2015). *Efecto de la densidad de explantes y volumen de medio de cultivo sobre la multiplicación in vitro de arándano (Vaccinium corymbosum L.) variedades Brigitta y Legacy*. Scientia Agropecuaria 6(1):31-40.
- Ruzic, D., Vujovic, T., Libiakova, G., Cerovic, R., Gajdosova, A. (2012). *Micropropagación in vitro de arándano alto del sur (Vaccinium corymbosum L.)*. Revista de Investigación sobre bayas pp. 97-103.

<http://MicropropagationinvitrohighbushblueberyVacciniumcorymbosumL.2012.pdf>.

Sánchez Calvo, L y Alvarenga Venutolo. (2014). *Callogénesis y establecimiento del cultivo de células suspensión de Uncaria Tomentosa (Wild.) D.C (uña de gato)*. Tecnología en Marcha, Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBIOT).

Sharry, S; Adema, M; Abedini, W. (2015). *Plantas de probeta: Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro*. Universidad Nacional de la Plata.

Toro Cano, M.A. (2009). *Mejoramiento del proceso de Investigación in vitro de plantas de arándano para las variedades Bluecrop, Duke y Misty*. (Tesis para título, Universidad de Chile).

ANEXOS

ANEXO 1. Datos generados en la evaluación de resultados

Etapa 2: Fase desinfección y Oxidación

Tabla 34

Conteo de N° de micro estacas contaminados y oxidados en función al tiempo de evaluación. Para definir el porcentaje de sobrevivencia..

TRATAMIENTOS	CONTEO N° EXPLANTES CONTAMINADOS Y OXIDADOS EN FUNCION AL TIEMPO									
	19/06/2017		22/06/2017		26/06/2017		29/06/2017		05/07/2017	
	CONTAMINADO	OXIDADO	CONTAMINADO	OXIDADO	CONTAMINADO	OXIDADO	CONTAMINADO	OXIDADO	CONTAMINADO	OXIDADO
T1	0	0	0	8	0	11	0	11	0	11
T2	0	0	15	2	17	2	18	2	18	2
T3	0	0	7	3	11	3	11	3	11	3
T4	0	0	11	3	12	3	13	3	13	3

Etapa 3: Establecimiento

Tabla 35*Resultados de la evaluación de los factores estudiados por tratamiento.*

TRATAMIENTO	REPETICION	N° HOJAS	N° TALLOS	ALTURA DE BROTE
T1	R1	3,3	0,7	0,69
T1	R2	0,5	0,3	0,13
T1	R3	0,8	0,4	0,17
T2	R1	5,5	0,7	0,77
T2	R2	7,3	0,9	1,08
T2	R3	5,7	0,6	1,01
T3	R1	4,9	0,9	1,05
T3	R2	10,2	1,1	1,62
T3	R3	9,9	1,1	1,38
T4	R1	12,4	1,2	2,6
T4	R2	13,8	1,4	2,18
T4	R3	9,1	1,1	1,73
T5	R1	5,4	1,2	0,66
T5	R2	11,8	1,3	2,08
T5	R3	8,1	1,2	1,03
T6	R1	0	0	0
T6	R2	0	0	0
T6	R3	0	0	0
T7	R1	0	0	0
T7	R2	0,4	0,1	0,08
T7	R3	5,2	0,6	0,6
T8	R1	7,2	0,9	0,97
T8	R2	4,1	0,9	0,61
T8	R3	4,8	0,9	0,5
T9	R1	10,4	1,4	1,39
T9	R2	6,5	1	0,64
T9	R3	14,8	1,4	1,76
T10	R1	8,3	1,1	0,73
T10	R2	7	0,9	0,73
T10	R3	11	1,3	1,11

Tabla 36*Resultados de N° de hojas de la fase de establecimiento..***Datos originales**

N° Hojas		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
Medio de											
Cultivo		WPM					MS				
2IP		0	1	2	4	8	0	1	2	4	8
I		3,3	5,5	4,9	12,4	5,4	0,0	0,0	7,2	10,4	8,3
II		0,5	7,3	10,2	13,8	11,8	0,0	0,4	4,1	6,5	7,0
III		0,8	5,7	9,9	9,1	8,1	0,0	5,2	4,8	14,8	11,0
TOTAL		4,6	18,5	25,0	35,3	25,3	0,0	5,6	16,1	31,7	26,3
PROMEDIO		2	6	8	12	8	0	2	5	11	9

Datos transformados $Y=\sqrt{X+1}$

N° Hojas		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
Medio de											
Cultivo		WPM					MS				
2IP		0	1	2	4	8	0	1	2	4	8
I		1,82	2,35	2,21	3,52	2,32	0,00	0,00	2,68	3,22	2,88
II		0,71	2,70	3,19	3,71	3,44	0,00	0,63	2,02	2,55	2,65
III		0,89	2,39	3,15	3,02	2,85	0,00	2,28	2,19	3,85	3,32
TOTAL		3,4	7,4	8,6	10,3	8,6	0,0	2,9	6,9	9,6	8,8
PROMEDIO		1	2	3	3	3	0	1	2	3	3

Tabla 37*Resultados de N° de tallos en la fase de establecimiento.***Datos originales**

N° Tallos		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
Medio de											
Cultivo		WPM					MS				
2IP		0	1	2	4	8	0	1	2	4	8
I		0,7	0,7	0,9	1,2	1,2	0	0	0,9	1,4	1,1
II		0,3	0,9	1,1	1,4	1,3	0	0,1	0,9	1	0,9
III		0,4	0,6	1,1	1,1	1,2	0	0,6	0,9	1,4	1,3
TOTAL		1,4	2,2	3,1	3,7	3,7	0,0	0,7	2,7	3,8	3,3
PROMEDIO		0	1	1	1	1	0	0	1	1	1

Datos transformados $Y=\sqrt{X+1}$

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
Medio de										
Cultivo	WPM					MS				
2IP	0	1	2	4	8	0	1	2	4	8
I	0,84	0,84	0,95	1,10	1,10	0,00	0,00	0,95	1,18	1,05
II	0,55	0,95	1,05	1,18	1,14	0,00	0,32	0,95	1,00	0,95
III	0,63	0,77	1,05	1,05	1,10	0,00	0,77	0,95	1,18	1,14
TOTAL	2,0	2,6	3,0	3,3	3,3	0,0	1,1	2,8	3,4	3,1
PROMEDIO	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1

Tabla 38

Resultados para Altura de brote en la fase de establecimiento.

Datos originales

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
Medio de										
Cultivo	WPM					MS				
2IP	0	1	2	4	8	0	1	2	4	8
I	0,69	0,77	1,05	2,6	0,66	0	0	0,97	1,39	0,73
II	0,13	1,08	1,62	2,18	2,08	0	0,08	0,61	0,64	0,73
III	0,17	1,01	1,38	1,73	1,03	0	0,6	0,5	1,76	1,11
TOTAL	1,0	2,9	4,1	6,5	3,8	0,0	0,7	2,1	3,8	2,6
PROMEDIO	0	1	1	2	1	0	0	1	1	1

Datos transformados $Y=\sqrt{X+1}$

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
Medio de										
Cultivo	WPM					MS				
2IP	0	1	2	4	8	0	1	2	4	8
I	0,83	0,88	1,02	1,61	0,81	0,00	0,00	0,98	1,18	0,85
II	0,36	1,04	1,27	1,48	1,44	0,00	0,28	0,78	0,80	0,85
III	0,41	1,00	1,17	1,32	1,01	0,00	0,77	0,71	1,33	1,05
TOTAL	1,6	2,9	3,5	4,4	3,3	0,0	1,1	2,5	3,3	2,8
PROMEDIO	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1

Etapa 4: Fase de Multiplicación y clonaje

Tabla 39

Resumen de la clasificación y conteo de 4 tipos de vigor para realizar el ciclo de clonaje.

CLASIFICACIÓN DE VIGOR		
TRATAMIENTO	VIGOR	CANTIDAD
T1	V3	1
	V2	2
	V1	0
	V0	3
T2	V3	2
	V2	7
	V1	3
	V0	8
T3	V3	10
	V2	2
	V1	1
	V0	3
T4	V3	11
	V2	6
	V1	4
	V0	5
T5	V3	6
	V2	4
	V1	4
	V0	11
T6	V3	0
	V2	0
	V1	0
	V0	0
T7	V3	0
	V2	2
	V1	2
	V0	1
T8	V3	0
	V2	5
	V1	5
	V0	2
T9	V3	2
	V2	8
	V1	4

	V0	9
T10	V3	2
	V2	4
	V1	9
	V0	8

Tabla 40

Promedio de variables evaluadas para determinar la tasa de multiplicación según grados de vigor.

ETAPA III MULTIPLICACION						
TRATAMIENTO	REPETICION	N° TALLOS SEMBRADOS	N° HOJAS	N° TALLOS	ALTURA	TASA DE MULTIPLICACION
V3	R1	1	9,11	1,0	2,1	7,5
V3	R2	1	9,12	0,1	1,7	6,38
V3	R3	1	6,36	0,7	1,4	6,77
V2	R1	1	11,30	1,4	2,4	4,8
V2	R2	1	7,55	0,9	1,6	4,45
V2	R3	1	11,24	0,5	2,1	5
V1	R1	1	14,09	1,8	3,1	3,6
V1	R2	1	9,05	1,6	0,9	2,2
V1	R3	1	17,25	2,3	1,9	3,2

Etapa 5: Enraizamiento

Tabla 41

Promedio de datos obtenidos sobre la influencia de los tratamientos para determinar el enraizamiento en las plántulas in vitro.

ETAPA IV ENRAIZAMIENTO						
TRATAMIENTO	REPETICION	Nº HOJAS	Nº TALLOS	ALTURA	Nº RAICES	ALTURA DE RAIZ
T1	R1	16	1,3	5,78	1,1	0,14
T1	R2	18,2	1,2	5,05	2,2	0,38
T1	R3	17,5	1,5	4,09	2,2	0,44
T2	R1	19,3	1,5	5,41	2,4	0,78
T2	R2	16,5	1,4	5,15	2,2	0,8
T2	R3	19,4	1,4	5,15	2,2	0,78
T3	R1	22,3	1,7	6,17	3,6	1,6
T3	R2	18,7	1,6	4,98	3,2	1,36
T3	R3	19	1,7	5,02	2,7	1,06
T4	R1	17,4	1	5,14	2	1,09
T4	R2	16,1	1,1	4,32	1,8	0,66
T4	R3	18	1,3	5,29	2,1	1,02

Tabla 42

Resultados evaluados en longitud de raíz para la fase de enraizamiento.

Datos originales

Nº Longitud de raíz

	T1	T2	T3	T4
Medio de Cultivo	WPM			
AIB	0	0,5	1	2
I	0,14	0,78	1,6	1,09
II	0,38	0,8	1,36	0,66
III	0,44	0,78	1,06	1,02
TOTAL	1,0	2,4	4,0	2,8
PROMEDIO	0	1	1	1

Datos transformados $Y=\sqrt{X+1}$

	T1	T2	T3	T4
Medio de Cultivo	WPM			
AIB	0	0,5	1	2
I	0,37	0,88	1,26	1,04
II	0,62	0,89	1,17	0,81
III	0,66	0,88	1,03	1,01
TOTAL	1,7	2,7	3,5	2,9
PROMEDIO	1	1	1	1

Tabla 43

Resultados para número de raíces en la fase de enraizamiento.

Datos originales

N° de Raíces	T1	T2	T3	T4
Medio de Cultivo	WPM			
AIB	0	0,5	1	2
I	1,1	2,4	3,6	2
II	2,2	2,2	3,2	1,8
III	2,2	2,2	2,7	2,1
TOTAL	5,5	6,8	9,5	5,9
PROMEDIO	2	2	3	2

Datos transformados $Y=\sqrt{X+1}$

	T1	T2	T3	T4
Medio de Cultivo	WPM			
AIB	0	0,5	1	2
I	1,05	1,55	1,90	1,41
II	1,48	1,48	1,79	1,34
III	1,48	1,48	1,64	1,45
TOTAL	4,0	4,5	5,3	4,2
PROMEDIO	1	2	2	1

Tabla 44*Resultados para la fase de enraizamiento para la variable peso fresco.***Datos originales**

Peso fresco mg	T1	T2	T3	T4
Medio de Cultivo	WPM			
AIB	0	0,5	1	2
I	30	190	190	210
II	50	230	250	180
III	100	150	200	200
IV	80	150	130	210
TOTAL	180,0	570,0	640,0	590,0
PROMEDIO	45,000	142,500	160,000	147,500

Datos transformados $Y=\sqrt{X+1}$

	T1	T2	T3	T4
Medio de Cultivo	WPM			
AIB	0	0,5	1	2
I	5,48	13,78	13,78	14,49
II	7,07	15,17	15,81	13,42
III	10,00	12,25	14,14	14,14
IV	8,94	12,25	11,40	14,49
TOTAL	22,5	41,2	43,7	42,0
PROMEDIO	7,516	13,732	14,579	14,017

Tabla 45*Resultados para la fase de enraizamiento para la variable peso seco.***Datos originales**

Peso Seco mg	T1	T2	T3	T4
Medio de Cultivo WPM				
AIB	0	0,5	1	2
I	3	10	30	30
II	5	20	30	20
III	10	20	40	30
IV	10	20	20	40
TOTAL	18,0	50,0	100,0	80,0
PROMEDIO	4,500	12,500	25,000	20,000

Datos transformados $Y=\sqrt{X+1}$

	T1	T2	T3	T4
Medio de Cultivo WPM				
AIB	0	0,5	1	2
I	1,73	3,16	5,48	5,48
II	2,24	4,47	5,48	4,47
III	3,16	4,47	6,32	5,48
IV	3,16	4,47	4,47	6,32
TOTAL	7,1	12,1	17,3	15,4
PROMEDIO	2,377	4,036	5,760	5,142

ANEXO 2. Preparación de materiales para la etapa de establecimiento.

Figura 19

Acondicionamiento de cámara de flujo laminar horizontal para realizar la siembra in vitro.



Figura 20

Preparación de materiales estériles para la siembra in vitro.



Figura 21

Fase de formación y desarrollo de una micro estaca de arándano en etapa de establecimiento.



Figura 22

Explantes procedente de medio WPM (Tratamientos 1-5).

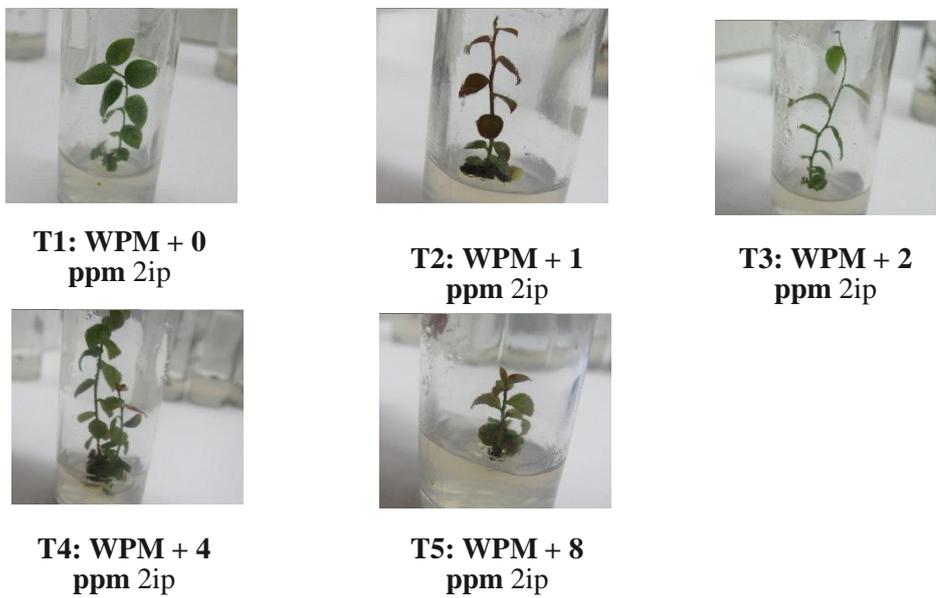


Figura 23

Explantos procedente de medio MS (Tratamiento 6-10).



T6: MS + 0 ppm
2ip



T7: MS + 1 ppm
2ip



T8: MS + 2 ppm
2ip



T9: MS + 4 ppm
2ip



T10: MS + 8 ppm
2ip

Figura 24

Explantos multiplicados según Vigor 1, 2 y 3.



Vigor 3 R1



Vigor 2 R1



Vigor 3 R2



Vigor 2 R2



Vigor 3 R3



Vigor 2 R3



Vigor 1 R1



Vigor 1 R2



Vigor 1 R3

Figura 25

Explantos en fase de enraizamiento según tratamiento 1 y 2.



T1: 0 ppm AIB



T2: 0.5 ppm AIB

Figura 26

Explantos en fase de enraizamiento según tratamiento 3 y 4.



T3: 1 ppm AIB



T4: 2 ppm AIB

Figura 27

Materiales para realizar proceso de peso fresco y peso seco.



Balanza



Frascos de vidrio



Algodón



Estufa eléctrica

Figura 28

Muestras de tallos y raíces según tratamientos (1-4).



T1 tallo



T1 raíz



T2 tallo



T2 raíz

T3 muestras



T3 raíz

T4 muestras



T4 tallo



T4 raíz

Figura 29

Muestras de plántulas ex vitro según tratamientos (1-4).

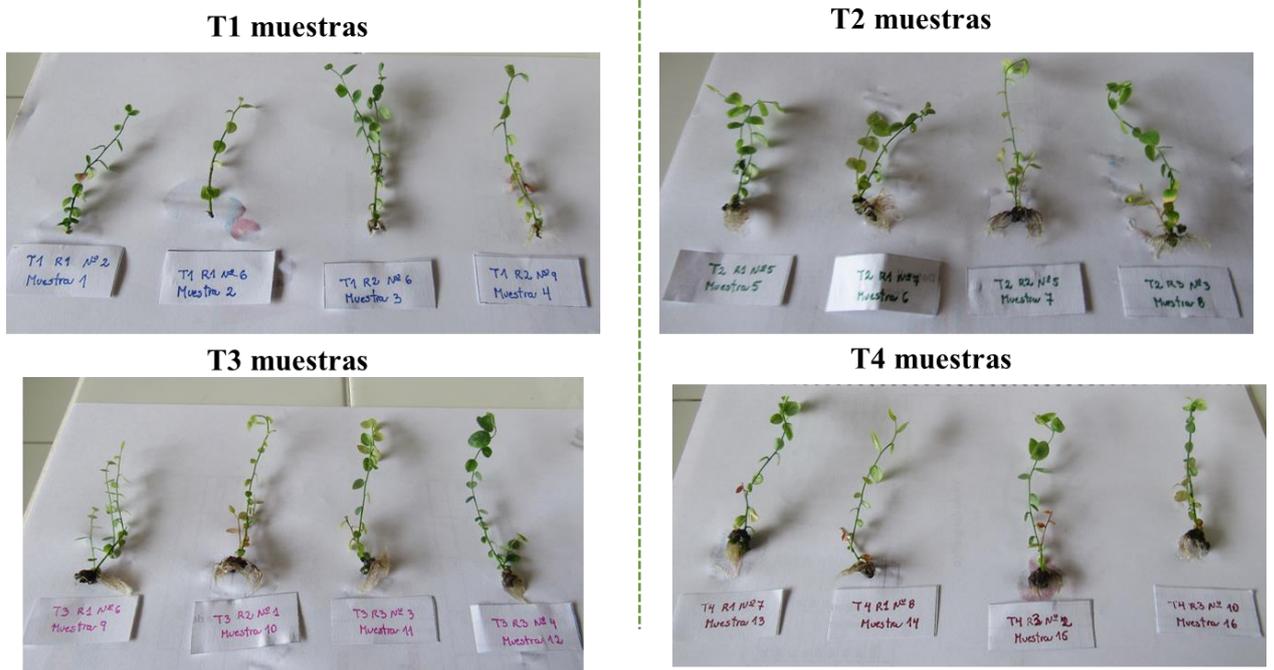


Figura 30

Muestras de plántulas ex vitro colocados en estufa.



Muestras de tallos en tubos de ensayo



Muestras envueltas en papel



Muestras en estufa

Figura 31

Muestras secas de plántulas ex vitro según tratamientos (1-4).



T1



T2



T3



T4