UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Tema: Evaluación de fitohormona para la división celular *in vitro* de *Myrcianthes rhopaloides*

Informe Final del Trabajos de Titulación. Opción Proyecto de investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Biotecnólogo, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Articulado al proyecto de Prácticas de Servicio Comunitario "Uso de componentes de multiplicación de microorganismos benéficos sólidos y líquidos en la Granja Experimental del Gobierno Provincial de Tungurahua en el cantón de Píllaro. Fase II" aprobado mediante Resolución Nro. UTA-CONVISO-2024-009 con fecha de 11 de abril de 2024

Autor: Jorge Antonio Medina Medina

Tutor: Dra. Helena Maritza De la Torre Olvera

Ambato – Ecuador

Febrero - 2025

APROBACIÓN DEL TUTOR

Dra. Helena Maritza De La Torre Olvera

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final del Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 20 de enero de 2025



Dra. Helena Maritza De La Torre

1309651998

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Jorge Antonio Medina, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Biotecnólogo son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Jorge Antonio Medina Medina

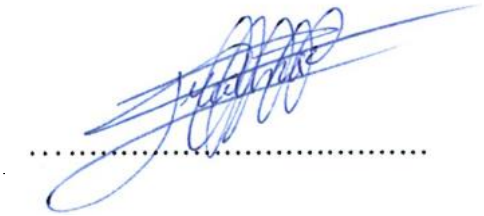
1804404810

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

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

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



Jorge Antonio Medina Medina

1804404810

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe final, modalidad trabajo de titulación, opción proyecto de investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:



Presidente del Tribunal



Mg. Alex Fabián Valencia Silva

1803121084



Dr. Orestes Darío López Hernández

1754784864

Ambato, 04 de Febrero de 2025

DEDICATORIA

A Dios, por ser quien ha permitido mi llegada hasta este punto de mi vida dándome la capacidad necesaria para cumplir mis deberes como estudiante, hijo y persona en esta vida, colocándome en el camino de muchas personas que me han enseñado a crecer y así mismo colocándome a mí en el camino correcto para seguir adelante toda esta vida es gracias a todo lo que ha puesto en mí y en mi entorno.

A mis padres por su increíble paciencia y amor, por ser mi guía en esta etapa de mi vida y darme su apoyo que permitieron seguir adelante en los momentos difíciles, siendo este logro el resultado de sus enseñanzas, valores y educación, gracias por siempre estar ahí incondicionalmente.

A mi hermana y cuñado por ayudarme a aprender durante mi desarrollo intelectual, quienes me han guiado en momentos de incertidumbre y de preocupación ayudándome a buscar siempre el expresar mi mayor potencial, enseñándome a crecer y lo que puedo lograr si me lo propongo.

A mis abuelitos, Jorge (Papi Jojo) y Noemi (Mamá Mimi) quienes siempre han estado pendientes de mí, especialmente tu Mamá Mimi quien me cuido desde pequeño, partite sin poderme ver concluir esta meta, seguro estoy que desde el cielo celebras esta meta que he logrado concluir.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a la Universidad Técnica de Ambato y a su Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología por darme la oportunidad de prepárame académicamente en sus instalaciones y el acceso a sus prestigiosos laboratorios.

Agradezco a todas las personas me han apoyado a desarrollar este proyecto el cual es la culminación de una vida universitaria.

A mi tutora, PhD. Helena de la Torre, por brindarme su guía, apoyo y sabiduría en los momentos de más incertidumbre.

A la Ing. Ruth Pérez por sus conocimientos y enseñanzas que hicieron posibles la culminación de este proyecto.

A mis padres por todo lo que han hecho por mí, por los sacrificios que han realizado y por ser los mejores padres que Dios pudo darme para enseñarme a mejorar y ser mejor que ellos mismos.

A mi hermana por todos los consejos dados, por ese tiempo invertido en sacarme de mi zona de confort para ser mejor en lo que hago y debo ser, y darme ese arranque necesario para tomar la iniciativa y proceder de manera correcta, por entenderme y por ser una hermana increíble

A mis amistades Milena, Monserrath y Noemi por su apoyo constante, los momentos vividos a lo largo de la carrera universitaria y a su agradable compañía en los momentos difíciles y por darme recuerdos que atesoraré siempre.

A mi enamorada Paola, por su apoyo constante, cariño y confianza en mis habilidades, agradezco cada momento que hemos vivido y por ser quien me ha ayudado a tener más confianza en mí mismo.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN iii
DERECHOS DE AUTOR iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO v
DEDICATORIA vi
AGRADECIMIENTO vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS viii
ÍNDICE DE TABLAS x
ÍNDICE DE FIGURAS xi
RESUMEN EJECUTIVO xii
ABSTRACT xiii
1. CAPÍTULO I – MARCO TEÓRICO 1
1.1 Antecedentes investigativos 1
1.1.1 Justificación 1
1.1.2 Micropropagación vegetal *in vitro* 2
1.1.3 División celular *in vitro* 2
1.1.4 Desinfección de los explantes vegetales 3
1.1.4.1 Hipoclorito de sodio 4
1.1.4.2 PHYTON® 5
1.1.4.3 Tween 20® 5
1.1.5 Viabilidad del Explante 5
1.1.6 Medios de cultivo 6
1.1.6.1 Gamborg B5 7
1.1.7 Fitohormonas 7
1.1.7.1 Acido indol-3-acético 7
1.1.8 Descripción taxonómica y botánica de *Myrcianthes rhopaloides* 8
1.2 OBJETIVOS 9
1.2.1 Objetivo general 9
1.2.2 Objetivos específicos 9
2. CAPITULO II – Metodología 10
2.1 Materiales 10
2.2 Métodos 11
2.2.1 Obtener explantes viables de *M. rhopaloides* a partir de plantas comerciales 11
2.2.1.1 Recolección y selección del material vegetal 11
2.2.1.2 Procesamiento de las muestras vegetales 12
2.2.1.3 Desinfección del material vegetal 12

2.2.1.4 Desinfección dentro de la cabina de flujo laminar 13
2.2.1.5 Diseño experimental 14
2.2.2 Ensayo de diferentes concentraciones de ácido indol 3 acético para inducir división celular *in vitro*. 15
2.2.2.1 Preparación de medios de cultivo suplementados con fitohormona 15
2.2.2.2 Siembra de explantes 17
2.2.2.3 Diseño experimental 17
3. CAPITULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN 19
3.1 Análisis y discusión de los resultados 19
3.2 Viabilidad de los explantes de *M. rhopaloides* 19
3.2.1 Protocolo de desinfección 19
3.2.2 Contaminación 21
3.2.3 Oxidación 23
3.3 Análisis de los efectos de las concentraciones de ácido indol 3 acético para inducir división celular *in vitro*. 26
4. CAPITULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 32
4.1 Conclusiones 32
4.2 Recomendaciones 32
5. Bibliografía 33
6. ANEXOS 39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. *Compuestos del medio de cultivo Gamborg B5* 7
Tabla 2. *Taxonomía de la especie M. rhopaloides* 8
Tabla 3. *Recursos materiales utilizados* 10
Tabla 4. *Descripción de tratamientos de fitohormonas* 16
Tabla 5. *Condiciones de tratamientos de fitohormona* 18
Tabla 6. *Porcentajes de contaminación, oxídación, viabilidad de M. rhopaloides* 20
Tabla 7. *Resultados máximos de los efectos de los tratamietos por semana* 26
Tabla 8. *Resultados obtenidos posterior al analisis de Tukey* 29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. *Especimen de Arrayan negro deuna edad aproximada de 3 años* 9
Figura 2. *Ubicación del lugar de donde se obtuvo el material vegetal* 11
Figura 3. *Selección del material vegetal* 12
Figura 4. *Protocolo de procesamiento y desinfección de explantes* 14
Figura 5. *Preparación de medios de cultivo suplementados con fitohormona* 16
Figura 6. *Explantes con presencia de contaminación* 21
Figura 7. *Explante con división celular y presencia de contaminación endógena* 22
Figura 8. *Explantes con presencia de óxidación y necrosis* 24
Figura 9. *Porcentaje de contaminacón, oxidación y viabilidad* 25
Figura 10. *Explantes a lo que se les aplicó los tratamientos* 27
Figura 11. *Explantes con división celular en forma de organogenesis* 27
Figura 12. *Evolución de la longitud de los brotes de los explantes* 28

RESUMEN EJECUTIVO

Myrcianthes rhopaloides conocido comúnmente como Arrayán Negro es una especie endémica del Ecuador, la cual ha sido usada de manera intensa debido a las propiedades y calidad de su madera, siendo de gran valor para la industria maderera, ocasionando que la población de esta especie se encuentre reducida. La presente investigación tiene como objetivo el evaluar la fitohormona ácido indol-3-acético (AIA) para la división celular *in vitro* por medio de micropropagación *in vitro*, desarrollando organogénesis en forma de hojas y brotes a partir de explantes, a partir de la aplicación de un protocolo de cultivo *in vitro* para desinfección con el fin de obtener explantes viables y una variación de cuatro tratamientos con medio Gamborg B5; tres de los cuales presentaran fitohormona en diferentes concentraciones de 0,5; 1 y 1,5 miligramos por litro de fitohormona y un tratamiento como control negativo sin presencia de fitohormona. Como resultado de la desinfección se obtuvo un porcentaje moderado de explantes viables donde la tasa de contaminación fue debida a la presencia de un hongo endófito. En la evaluación de los tratamientos de fitohormona el tratamiento tres de 1,5 de concentración de ácido indol-3-acético presentó una respuesta de formación de hojas y brotes a la tercera semana de iniciado el experimento, manteniendo de incremento gradual durante las 7 semanas que duró la incubación de los explantes.

Palabras clave: Explantes, micropropagación, *in vitro*, división celular, fitohormona

ABSTRACT

Myrcianthes rhopaloides commonly known as Black Arrayan is an endemic species of Ecuador, which has been used intensively due to the properties and quality of its wood, being of great value for the timber industry, causing the population of this species to be reduced. The objective of this research is to evaluate the phytohormone indole-3-acetic acid (IAA) for in vitro cell division by means of in vitro micropropagation, developing organogenesis in the form of leaves and shoots from explants, from the application of an in vitro culture protocol for disinfection in order to obtain viable explants and a variation of four treatments with Gamborg B5 medium; three of which will present phytohormone in different concentrations of 0,5; 1 and 1,5 milligrams per liter of phytohormone and one treatment as a negative control without the presence of phytohormone. As a result of the disinfection, a moderate percentage of viable explants was obtained, where the contamination rate was due to the presence of an endophytic fungus. In the evaluation of the phytohormone treatments, treatment three with a 1,5 concentration of indole-3-acetic acid showed a response of leaf and shoot formation in the third week after the start of the experiment, maintaining a gradual increase during the 7 weeks that the explants were incubated.

Keywords: Explants, micropropagation, in vitro, cell division, phytohormone

1. CAPÍTULO I – MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes investigativos

1.1.1 Justificación

La deforestación generalmente es provocada por las diferentes actividades humanas, como la minería y actividades petroleras; siendo una de las de más alto impacto la agricultura; esto debido a la tala indiscriminada de bosques para el uso de terrenos con fines de producción de cultivos; llevando a varias especies al peligro de extinción como *Licaria excerta*, *Eudema nubigenia* y el arrayán negro (*Myrcianthes rhopaloides*) catalogándola por el Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica del Ecuador como próximamente extinta **(Duffau y Guachimboza, 2020)**. El CITHES (Centro de Investigación para el Territorio y Hábitat Sostenible) revela en un estudio desarrollado en la zona noroccidental de la cordillera del distrito metropolitano de Quito apenas la presencia de un solo espécimen de *M. rhopaloides* **(Uvidia et al., 2022)**.

El arrayan negro no ha tenido investigaciones previas acerca de su desarrollo *in vitro,* debido a que es una especie endémica del Ecuador la cual su población se ha disminuido al ser explotado por su madera; no existe información concreta de muchas de sus características, aplicaciones y en especial de su micropropagación *in vitro,* como ejemplo sus reacciones ante la presencia de una fitohormona **(Quishipi, 2022)**. Por lo anterior, es muy escaso su aprovechamiento fuera de este ámbito industrial o en su papel ecológico como un fijador de suelo que evita los deslizamientos de tierra debido a sus fuertes raíces **(Silva et al., 2016)**. El resto de información existente es acerca de sus propiedades antimicrobianas de manera eficiente contra *Streptococcus mutans* y *Streptococcus pyogenes* **(Torres et al., 2017)**. Las investigaciones han disminuido a lo largo de los años debido a la falta de especímenes, esto por el continuo consumo industrial de esta especie.

Ante la problemática de la deforestación, la presente investigación plantea el evaluar una fitohormona en este caso el ácido indol-3-ácetico, en explantes de *M. rhopaloides* para la estimulación de la división celular en forma de organogénesis eficiente, eficaz y en menor tiempo, con el fin de reforestar y dar un soporte estructural evitando deslizamientos de tierra; asi tambien logrando la conservación de esta especie; abriendo el interés en la reproducción *in vitro* de especies autóctonas del Ecuador.

1.1.2 Micropropagación vegetal *in vitro*

El termino *in vitro* se refiere directamente a las condiciones confinadas y controladas, por otro lado, la micropropagación es una técnica que engloba al cultivo *in vitro* donde diversas partes de la planta como sus células, protoplastos, explantes, entre otros; son usados para reproducir plantas en un medio de cultivo óptimo para su crecimiento en condiciones asépticas **(Orellana et al., 2024).**

La micropropagación es un proceso por el cual se establece un protocolo que permite desarrollar un tipo de material vegetal hasta obtener un producto en específico, que pueden llegar a ser plantas estables y libres de patógenos, asi como especies vegetales mejoradas e incluso compuestos bioactivos, entre otros **(Ordoñez et al., 2022)**.

Este proceso por lo general se encuentra dividido en etapas: existe una etapa de establecimiento, en la cual el material vegetal es recolectado, desinfectado y cultivado en un medio de cultivo que puede o no presentar fitohormonas para inducir el desarrollo de tejidos u órganos seguido a esta etapa si es exitosa se realiza la etapa de multiplicación, donde los tejidos desarrollados se subcultivan para proliferar o reproducirse rápidamente, para despues realizar una etapa de enraizamiento para inducir el crecimiento de raíces funcionales y como última etapa se llevan a las plantas producidas a una etapa de aclimatación esto con la finalidad de que se puedan adaptar a condiciones ambientales *ex vitro* o condiciones exteriores **(Delgado et al., 2023)**.

Entre las aplicaciones más significativas de este proceso son la producción masiva de plantas sin necesidad de depender de variables climáticas como las estaciones; la preservación y conservación de especies y la investigación científica que permite el desarrollo de nuevas tecnologías de mejoramiento de la agricultura llevándola a convertirse en una agricultura sostenible **(Hasnain et al., 2022)**.

1.1.3 División celular *in vitro*

La división celular *in vitro* es un proceso biológico por el cual se induce al desarrollo de material orgánico de seres vivos; sean de animales, vegetales y/o microrganismos como bacterías u hongos para la reproducción de células en un medio de cultivo en condiciones y factores controlados según la

necesidad del tipo de material orgánico **(Albarran y Fuenmayor, 2010) (Chacón Campana et al., 2021)**.

Este método es clave dentro de la micropropagación vegetal *in vitro;* donde la división celular se enfoca específicamente en especies vegetales, porque permite la reproducción de tejido vegetal desde fragmentos de una planta que usualmente pueden ser yemas, tallos y/o explantes, donde a través del uso de medios de cultivos, fitohormonas y con las condiciones ambientales correctas se condiciona a esos fragmentos a realizar una división celular y diferenciación, donde en relación a las condiciones y estímulos que se aplicaron es posible diferentes tipos de diferenciación como pueden ser el desarrollo de callos, brotes, hojas y raíces **(Bustamante et al., 2022) (Mollohuanca et al., 2022)**.

Este proceso de división celular *in vitro* vegetal también es llamado organogénesis, de la cual existen dos tipos la directa e indirecta, en tipo directa, se utiliza tejido vegetal para obtener brotes, hojas, y/o raíces sin necesidad de desarrollar obligatoriamente callogénesis para producir los órganos anteriormente mencionados. Mientras que en el tipo indirecta se forma un paso de transición al formar el callo del cual se desarrollarán los órganos de la planta **(Jadid et al., 2024)**.

1.1.4 Desinfección de los explantes vegetales

Es una etapa del procedimiento de micropropagación *in vitro* de crucial importancia, debido a que su finalidad es la de garantizar un tejido vegetal aséptico, libre de la presencia de microorganismos y/o contaminantes que puedan afectar el desarrollo y crecimiento del explante, por este motivo se utilizan agentes desinfectantes variados como el etanol, hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio, formulas antifúngicas, detergentes como el Tween 20®, e incluso químicos que pueden llegar a ser peligrosos como el cloruro de mercurio ($HgCl_2$) **(Hernández et al., 2023)**.

El etanol es un compuesto químico orgánico compuesto de una cadena alifática que presenta un grupo hidroxilo, se ha utilizado de manera amplia y a los largo de la historia en medicina como un poderoso antiséptico, se aplica como un desinfectante para limpieza tanto para infraestructura y materiales como para tejidos vivos e incluso heridas esto, debido a ser capaz de eliminar microorganismos , en este caso se utiliza con los explantes para la eliminación de posibles microorganismos contaminantes que se encuentren en el material vegetal para cultivar **(Mongelós et al., 2020)**.

La forma en que el etanol actúa frente a los microorganismos para poder eliminarlos es a través del mecanismo de desnaturalización de proteínas donde el etanol penetra en el microorganismo y destruye la estructura del mismo interrumpiendo sus funciones como su metabolismo y capacidad de replicación; posterior a esto provoca una eliminación por disolución de los lípidos de las membranas celulares causando lisis celular u muerte del microorganismo **(Greim, 2023)**.

1.1.4.1 Hipoclorito de sodio

El hipoclorito de sodio es un compuesto químico desinfectante utilizado en variedad de procesos industriales, usado por ser efectivo en la eliminación de microorganismos variados, puede eliminar de manera rápida esporas, bacterias e incluso virus; estas propiedades se deben gracias que este compuesto se descompone tanto en un ion de hipoclorito, un ácido hipocloroso e incluso en cloro libre los cuales son considerados como desinfectantes de grado clínico, estos causan una oxidación de las enzimas y estructuras celulares importantes de los microorganismos, en especial con los grupos sulfhidrilos (-SH) de las proteínas provocando inmediata desnaturalización y destrucción de toda ruta metabólica del microorganismo y mecanismo de replicación, dañando membranas celulares e interfiriendo incluso con el material genético del mismo, es esta alta capacidad oxidante la que hace que el hipoclorito de sodio sea un desinfectante tan poderoso contra todo tipo de microorganismos **(Pereira et al., 2015) (Jones y Joshi, 2021)**.

Investigaciones realizadas por **Hernández et al., (2023)** demuestran que es posible estimar tanto concentraciones como el tiempo de uso del hipoclorito de sodio para la desinfección superficial del tejido vegetal, como ejemplo para el pasto CTT-115, se usa de manera recomendada una concentración de hipoclorito de sodio al 2% por 10 minutos reduciendo la contaminación microbiana.

El tiempo de desinfección y concentración de hipoclorito tiende siempre a depender de la especie la cual va a ser sometida al compuesto, por ende, va a variar de especie a especie como ejemplo en estudios realizados por **Díaz et al., (2023)**, para el pasto *Cenchrus purpureus* se utiliza una concentración de 2% y 15 minutos, por lo general la concentración máxima a la que se utiliza el hipoclorito de sodio es de 2% esto debido a la fitotoxicidad que puede provocar, pero para otras especies como *Swietenia macrophylla* especie utilizada por **Salazar y Reyes, (2024)** el porcentaje es de un 3% de concentración por 10 minutos.

1.1.4.2 PHYTON®

PHYTON® es un fungicida y bactericida que tiene una acción sistemática en la pared celular de hongos y baterías debido a que su ingrediente activo es el sulfato de cobre pentahidratado que penetra a la planta, su mecanismo de acción se basa en la actividad de interferencia de los iones de cobre sobre las funciones enzimáticas de los microorganismos, terminando por desnaturalizar sus proteínas y eliminando sus paredes celulares, este producto evita el desarrollo de la resistencia por parte de los patógenos **(SERFI, 2020)**.

Para el uso de estos compuestos para la desinfección es de vital importancia ajustar tanto las concentraciones como los tiempos para que los tejidos vegetales se expongan, para evitar daños a los tejidos, inhibición del crecimiento e incluso necrosis completa del explante, que puedan dañar la viabilidad del explante.

1.1.4.3 Tween 20®

El Tween 20® o polisorbato 20 es un derivado del sorbitol un tipo de alcohol de azúcar natural. Este es un agente tensioactivo de tipo no iónico usado generalmente para variedad de aplicaciones como emulsionante, agente humectante, para alimentos y en este caso como detergente o agente de lavado para desinfección de explantes en cultivos *in vitro*, tambien es un solubilizante de proteínas, además de que se puede usar como un excipiente estabilizante para emulsiones **(Quinn et al., 2022).**

Como desinfectante, tiene la finalidad de disminuir la tensión superficial del agua, permitiendo un mejor contacto entre la superficie del tejido vegetal y las soluciones del protocolo de desinfección, esto facilita el que muchos tipos de contaminantes sea eliminados **(Volk, 2020).**

1.1.5 Viabilidad del Explante

La micropropagación *in vitro* a pesar de ser una técnica de cultivo que lleva siendo estudiada y empleada en la industria agricola y otras relacionadas por un largo tiempo, no está libre de dificultades de las cuales resalta la viabilidad del explante, es decir, su calidad y capacidad para desarrollarse como un espécimen.

La viabilidad se puede ver afectada principalmente por la contaminación, causada por una alta variedad de microorganismos que pueden tener varios orígenes, se pueden describir tres tipos de contaminación según el origen, estos son contaminación ambiental, por el usuario; estas dos tambien se las pude definir como fallas en los procedimientos de cultivo; y aquella contaminación que puede acompañar al mismo explante **(Lezcano et al., 2021)**.

Otro problema que se presenta afecta la viabilidad del explante es la oxidación, definida como la liberación de radicales libres de los componentes celulares del mismo explante, este problema generalmente se presenta al momento de cultivar los explantes, presentando una marcada coloración oscura en el medio de cultivo, e incluso el mismo explante pierde su tonalidad verde para oscurecerse, este oscurecimiento se debe a una mezcla compleja de sustancias fenólicas; esto sucede debido a el estrés al que han sido sometidos los explantes, refiriéndose tanto a cortes y a la desinfección del mismo durante los procesos de cultivo *in vitro;* al provocarse oxidación en el explante el crecimiento y desarrollo del explante se puede ver afectado, reducido e incluso inhibido **(Azofeifa, 2008)**.

Las técnicas de cultivo *in vitro* están sujetas a un gran número de variables que limitan la reproducibilidad, es decir, que no siempre los resultados realizados en un laboratorio serán obtenidos en otro; siendo muy común que protocolos ya estandarizados o descrito en literatura no sean completamente efectivos y deban sufrir modificaciones al momento de realizar el cultivo **(Nikoloff et al., 2020).**

1.1.6 Medios de cultivo

Los medios de cultivo son una mezcla de sustancias como nutrientes, fitohormonas, vitaminas, minerales, micronutrientes y macronutrientes que tienen como objetivo la estimulación de crecimiento y desarrollo de; en este caso; tejido vegetal, todo esto en condiciones estériles, permitiendo controlar una gran variedad de factores del cultivo *in vitro* **(Middelhoff y Peselmann, 2023)**.

1.1.6.1 Gamborg B5

Medio de cultivo *in vitro* el cual beneficia en gran medida a los miembros de la familia Fabaceae, que son tanto árboles como arbustos. En su composición se encuentran fuentes inorgánicas de nitrógeno como el nitrato de potasio, nitrato de amonio y/o sulfato de amonio que brindan apoyo al desarrollo de una pared celular gruesa y un aumento a la resistencia a la planta contra los daños ocasionados por baja temperatura **(Plantigen, 2017)**.

Tabla 1

Compuestos del medio de cultivo Gamborg B5

Componentes	**Concentración (mg/L)**
$(NH_4)_2SO_4$ (Sulfato de amonio)	134
KNO_3 (Nitrato de potasio)	2,500
$MgSO_4$ (Sulfato de magnesio)	250
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (Cloruro de calcio di hidratado)	150
KH_2PO_4 (Fosfato monopotásico)	150

Nota. Composición obtenida de **(Plantigen, 2017)** y **(EcuRed, 2023)**

1.1.7 Fitohormonas

Una planta para que pueda desarrollarse y funcionar adecuadamente necesita de diversos compuestos y/o sustancias químicas para controlar, promover, inhibir y alterar las actividades celulares de órganos y tejidos; las fitohormonas son estos compuestos. Dentro de los mecanismos para regular sus sistemas se encuentra el uso de hormonas vegetales, estas son llamadas fitohormonas. Estas son compuestos químicos que son producidas por tejidos de la planta siendo completamente diferentes a los nutrientes principalmente porque las fitohormonas se encargan de alterar el crecimiento de la planta para su desarrollo **(Gopu et al., 2020)**.

1.1.7.1 Acido indol-3-acético

Una fitohormona que ha sido utilizada de manera constante en el cultivo *in vitro* para las plantas de formación leñosa, esto gracias a que posee la característica de estimular el crecimiento tanto de raíces

como de brotes. Causa un impacto efectivo del ácido indol-3-acético (AIA) en el desarrollo de raíces de los tejidos vegetales, transformándolo en un componente básico y esencial presente en los medios de cultivo para propagar especies de este tipo. Tambien es capaz de inducir embriogénesis, un efecto de suma importancia para la producción industrial de plantas **(Karakeçili et al., 2019)**.

1.1.8 Descripción taxonómica y botánica de *Myrcianthes rhopaloides*

Arrayan negro es una especie de la familia *Myrtaceae,* de características leñosas una altura promedio de 20 metros y un tronco con una envergadura de entre 50 a 80 cm, posee un alto rango de vida lo que lo hace extremadamente longevo, posee una corteza pálida y de placas desprendibles, sus raíces son fuertes y resistentes; con un follaje denso y oscuro, posee bayas de tono morado oscuro e incluso color vino totalmente comestible **(Proença et al., 2023)**.

Crece generalmente en áreas con características variadas siendo capaz de sobrevivir en ambientes secos como húmedos, es especialmente resistente a las áreas nubladas debido a que es capaz de tolerar la falta de luz y la presencia de lluvias de entre 800 a 1500 mm de lluvia. Es usual encontrar arrayan negro en varias provincias del Ecuador, mucho más en la región andina del sur del Ecuador a una altitud máxima de 2850 msnm **(Armijos et al., 2018)**.

Tabla 2

Taxonomía de la especie Myrcianthes rhopaloides

Reino	Plantae
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Myrtales
Familia	Myrtaceae
Subfamilia	Myrtoideae
Género	Myrcianthes
Especie	Myrcianthes rhopaloides
Nombre común	Arrayán Negro

Nota: Información obtenida de **(Quishipi, 2022)**

Figura 1

Espécimen de arrayan negro de una edad aproximada de 3 años



Nota. Imagen obtenida de la parroquia Izamba

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo general

Evaluar una fitohormona para la división celular *in vitro* de *Myrcianthes rhopaloides*.

1.2.2 Objetivos específicos

- Obtener explantes viables de *Myrcianthes rhopaloides* a partir de plantas comerciales
- Ensayar diferentes concentraciones de ácido indol 3 acético para inducir división celular *in vitro.*

2. CAPITULO II – Metodología

2.1 Materiales

Para realizar el presente trabajo de titulación de tipo experimental se hizo uso de las instalaciones de los laboratorios UODIDE de la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología además de los siguientes materiales y reactivos detallados en la siguiente tabla.

Tabla 3

Recursos materiales utilizados

Recursos materiales	
Reactivos	
Ácido indol-3-ácetico	Jabón liquido
Agua destilada	Medio Gamborg B5
Agar-agar	Phyton
Azúcar	Tween 20®
Etanol 70%	
Hidróxido de sodio	
Hipoclorito de sodio 10%	
Equipos	**Materiales**
Agitador magnético	Botellas de tapa azul
Autoclave	Bisturí
Balanza analítica	Fundas herméticas
Cámara de flujo laminar	Micropipetas
Microondas	Mecheros de alcohol
Potenciómetro	Papel aluminio
Refrigeradora	Pinzas
	Plástico film
	Ramas de arrayan negro
	Tubos de ensayo
	Tijeras
	Vasos de precipitación

Nota. Materiales y equipos proporcionados por los laboratorios de la UOIDIDE de la Facultad de Ciencias e Ingeniera en Alimentos y Biotecnología

2.2 Métodos

2.2.1 Obtener explantes viables de *M. rhopaloides* a partir de plantas comerciales

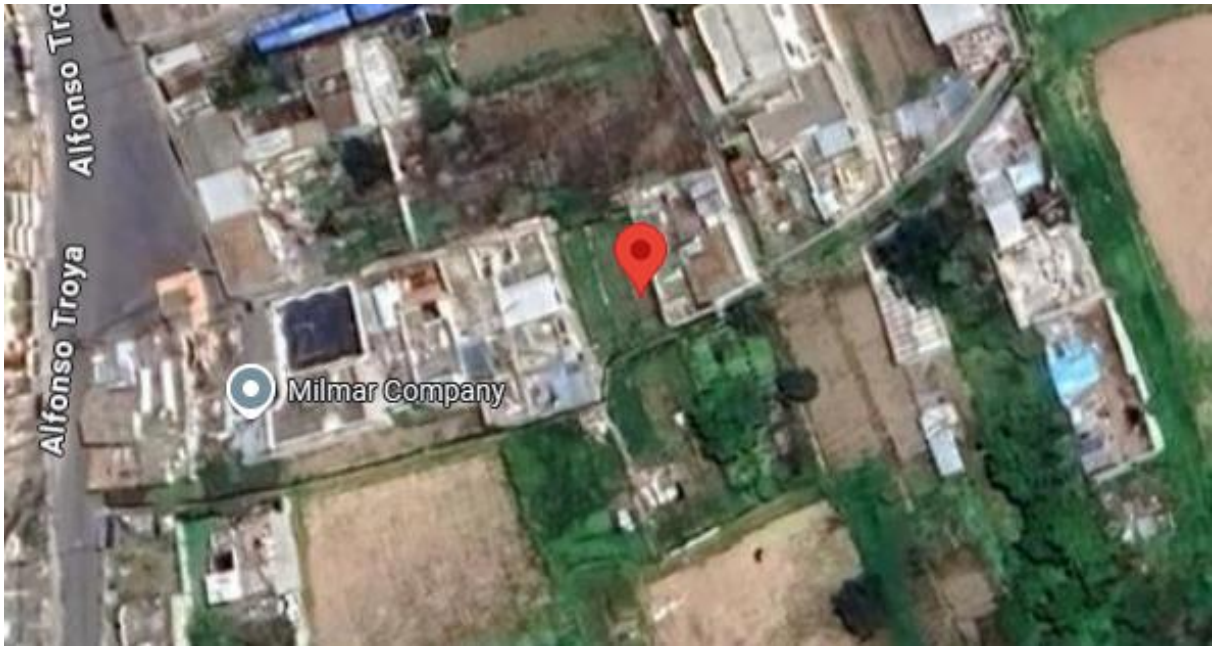
2.2.1.1 Recolección y selección del material vegetal

Para realizar el cultivo *in vitro* y la respectiva división celular para la obtención ya sea de hojas, callos y brotes, se usó el material vegetal de plantas de arrayán negro comercial ubicado en Izamba, especímenes de una edad aproximada de 3 años.

El material vegetal fue seleccionado según las características y condiciones físicas en las que se encontraba el espécimen, evitando aquellas muestras con signos visibles de marchitamiento, pudrición, necrosis o la presencia de algún tipo de plaga u hongo. Para recolectarlas se hizo uso de tijeras desinfectadas con alcohol al 70%, siendo colocadas las muestras en fundas herméticas y humedecidas con agua potable o destilada para su transporte **(Aguilera y Guedes, 2022)**.

Figura 2

Ubicación del lugar de donde se obtuvo el material vegetal



Nota. Muestras tomadas en el Barrio San Isidro, Izamba (-1.2308020, -78.5854140)

Figura 3

Recolección del material vegetal



Nota. Imagen elaboración propia

2.2.1.2 Procesamiento de las muestras vegetales

A las muestras recolectadas se procedió a eliminar las hojas de manera total con material esterilizado y en una zona limpia y desinfectada o dentro de la cámara de flujo esto con la finalidad, esto con el fin de disminuir la posible contaminación ambiental en las heridas de los cortes a causa de la eliminación de las hojas.

Las hojas se eliminan en este caso debido a que se tomaron los explantes de nudos, entrenudos y la sección apical, además de que al realizar esta acción se reduce el riesgo de contaminación, debido a que las hojas pueden portar microorganismos y suciedad de difícil eliminación al momento de realizar la desinfección de los explantes, esto también disminuye la producción de fenolización que puede alterar la composición del medio de cultivo y causar inhibición del explante **(Toro de la Cruz et al., 2021)**.

2.2.1.3 Desinfección del material vegetal

Posterior al procesamiento de las muestras vegetales se realizó un lavado en agitación por quince minutos en constante agitación, en presencia de una solución compuesta por 50 ml de agua y 10 ml de jabón líquido comercial lavaplatos, al finalizar los 15 minutos se realizó un cepillado leve, junto a tres enjuagues de agua de la llave para eliminar los restos de jabón; este procedimiento es tanto para eliminar posibles fuentes de contaminación exógena por residuos como tierra, polvo y otras como esporas y/o microorganismos; como para causar una debilitación parcial de las paredes celulares, para después los

tratamientos que corresponden al uso del antifúngico PHYTON® y del hipoclorito de sodio al 2% (v/v) **(Bolaños et al., 2019) .**

Una vez finalizado el proceso de desinfección previa se procedió a realizar el tratamiento de desinfección de los explantes con PHYTON® e hipoclorito de sodio (NaClO) comercial.
En primera instancia, los explantes fueron sometidos a una disolución de antifúngico PHYTON® en una proporción 1ml/100ml siendo 1 ml del compuesto en 100ml de agua destilada estéril, y llevados a agitación constante por 35 minutos, terminado el tiempo se los enjuago tres veces con agua fría destilada **(Chávez y Sotamba, 2024) (Cárdenas, 2015).**

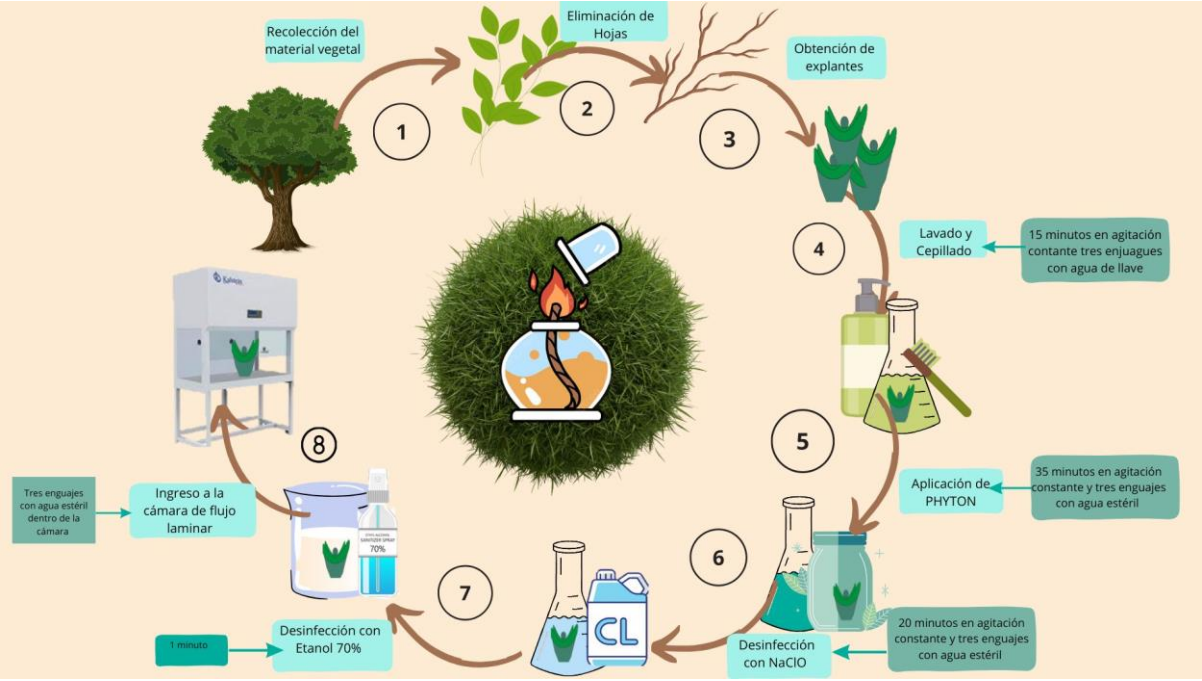
Una vez terminado la exposición de los explantes al antifúngico PHYTON® y realizados los enjuagues para eliminar restos del compuesto se procede a realizar una disolución de hipoclorito de sodio al 2% de concentración a partir de una solución stock de hipoclorito de sodio comercial (Cloro) de concentración al 10% (p/p) de cloro activo, colocando 100 ml de la disolución al 2% con dos gotas de tween 20 en cada vaso de precipitado, los explantes fueron sumergidos en esta disolución y llevados a constante agitación por 20 minutos, seguido posteriormente al terminar el tiempo de desinfección por tres enjuagues de agua estéril para eliminar los restos de hipoclorito de sodio y detener su acción para evitar fitotoxicidad y/o alteraciones en el medio de cultivo al realizar la siembra *in vitro* **(Lezcano et al., 2021).**

2.2.1.4 Desinfección dentro de la cabina de flujo laminar

Después de la desinfección de explantes con el tratamiento de hipoclorito los explantes y los respectivos enjuagues estos se sumergieron en una solución de etanol al 70% durante 1 minuto para ser llevados a condiciones estériles dentro de la cámara de flujo previamente esterilizada, para después de terminado el minuto realizar tres enjuagues con agua destilada estéril dentro de la cámara para iniciar el proceso de cultivo *in vitro* **(Zaldua, 2024).**

Figura 4

Protocolo de procesamiento y desinfección de explantes



Nota. Elaboración propia

2.2.1.5 Diseño experimental

Para la recolección y estimación de los datos obtenidos posterior a la siembra se utilizó el software Microsoft Excel, donde se utilizaron la siguiente ecuación para medir el porcentaje de explantes contaminados, tomando en cuenta que las observaciones de los explantes sembrados se realizaron a partir del momento de la siembra hasta 20 días posterior a la siembra.

$$\%C = \frac{\#N_c}{T_N} * 100$$

Donde:

$\%C = Porcentaje\ de\ contaminación$

$\#N = Número\ de\ explantes\ contaminados$

$T_N = Total\ de\ explantes$

Para el porcentaje de oxidación o fenolización debe tomarse en cuenta la apariencia de los explantes debido a que se la fenolización se encuentra relacionada al estrés al que es sometido la planta, este estrés es provocado de manera general por la manipulación y procesamiento de los explantes tanto los cortes como los compuestos químicos desinfectantes la provocan, este signo se presenta visualmente como cambios de coloración ya sea en el explante como en el medio de cultivo, siendo usual la aparición una

especie de niebla o nube de tonalidades que van de amarillo a negro, si el explante presenta una tonalidad negra se considera una necrosis completa estos signos suelen aparecen en un tiempo aproximado de 7 días a partir del día de siembra **(Layza et al., 2021) (Balero et al., 2002).**
En este caso se utiliza la siguiente formula:

$$\%Ox = \frac{\#N_o}{T_N} * 100$$

Donde:

$\%Ox = Porcentaje\ de\ oxidados$

$\#N_o = Número\ de\ explantes\ oxidados$

$T_N = Total\ de\ explantes$

Por último, para obtener el porcentaje de viabilidad se contabiliza los explantes sobrevivientes hasta el final del periodo de tiempo establecido aproximadamente a 40 días de iniciada la siembra de los explantes, con el uso de la siguiente formula:

$$\%Vi = \frac{\#N_v}{T_N} * 100$$

Donde:

$\%Vi = Porcentaje\ de\ viables$

$\#N_v = Número\ de\ explantes\ viables$

$T_N = Total\ de\ explantes$

2.2.2 Ensayo de diferentes concentraciones de ácido indol 3 acético para inducir división celular *in vitro*.

2.2.2.1 Preparación de medios de cultivo suplementados con fitohormona

La preparación del medio de cultivo Gamborg B5 fue realizada a partir del protocolo usado en la metodología de los estudios de **Meneses et al., (2022)** con modificaciones necesarias por el tipo de medio de cultivo usado, al medio de cultivo se lo suplemento con sacarosa y se ajustó el pH en un rango de 5,6 a 5,8, para solidificar los medios se usó agar-agar en forma de escamas.

La suplementación de fitohormonas se realiza según las cantidades específicas de los medios de cultivo en este caso se usaron 250 ml de cada tratamiento de medio de cultivo suplementado con 1,75g de agar, 7,5 gramos de sacarosa y la cantidad recomendada de medio de cultivo Gamborg B5 según el proveedor

de 3,4 g/l; según los estudios de **Harutyunyan et al., (2022)** se usaron las mismas cantidades para los tratamientos de 0,5 mg/L, 1mg/L y 1,5 mg/L, estas cantidades se consideran un protocolo estándar para especies vegetales de las cuales no tienen un registro de cómo reaccionan ante la presencia de la fitohormona AIA, estos se realizaron a partir de una solución stock de 4 mg/ml.

Una vez pesados y preparados los componentes del medio de cultivo se esterilizaron en la autoclave por 20 minutos a 121°C, posterior a esto se llevaron a la cámara de flujo laminar donde en tubos de ensayo sin tapa esterilizados alrededor de dos lámparas de alcohol se dosifico de 12 a 15 ml en cada tubo y se sellaron con papel film, para ser monitoreados por 7 días para observar si se desarrolla posibles contaminaciones en el medio de cultivo.

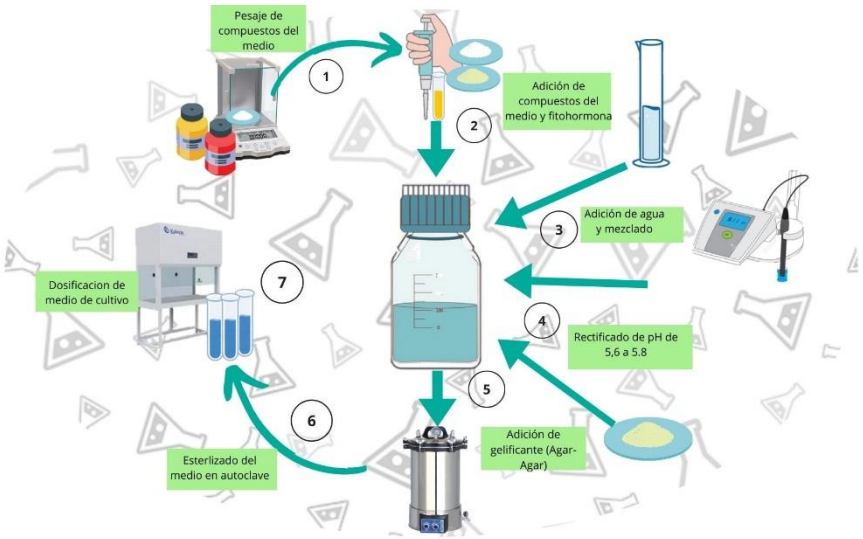
Tabla 4

Descripción de tratamientos de fitohormona

Tratamiento	Medio de cultivo	Concentración de fitohormona (AIA)
T1	Gamborg B5	0,5 mg/L
T2	Gamborg B5	1 mg/ml
T3	Gamborg B5	1,5 mg/ml
T4 (Control)	Gamborg B5	-

Figura 5

Preparación de medios de cultivo suplementados con fitohormona



Nota. Elaboración propia

2.2.2.2 Siembra de explantes

Después de trascurridos los siete días de monitoreo de los medios de cultivo dosificado, dentro de la cabina de flujo laminar y rodeado de dos mecheros, se sembraron los explantes; que fueron pasados por los procesos de desinfección, en el medio Gamborg B5; antes de iniciar este proceso los materiales necesarios como pinzas, bisturíes y papel film fueron previamente esterilizados y expuestos a la luz UV de la cámara de flujo, además tanto pinzas como bisturíes se esterilizaban constantemente por medio de flameo con etanol de 96% asi provocando un color incandescente.

Terminado el proceso de siembra a cada boca de los tubos de ensayo se los flameo y cerro con papel film inmediatamente, posterior al sellado de cada tubo se los transporto a un estante de micropropagación en el área de los laboratorios académicos a una temperatura de $23 \pm 2°C$ en un fotoperiodo de 16 horas de luz y un ciclo nocturno de 8 horas de oscuridad para estimular el desarrollo de los explantes **(Indacochea et al., 2018) (Romero Alves, 2018)**.

2.2.2.3 Diseño experimental

2.2.2.3.1 Análisis de datos de la influencia de la fitohormona

Para evaluar la división celular, se tomó como variables de respuesta a evaluar la longitud los brotes, el número de brotes y el número de hojas **(Cabrera et al., 2024).** Los datos se procesaron inicialmente en Microsoft Word para después realizarse un diseño experimental unifactorial DCA tambien conocido como Diseño completamente aleatorizado junto con un análisis de varianza ANOVA, esto para analizar los efectos de un solo tratamiento en este caso la concentración de fitohormona en la división celular del explante en forma de organogénesis de hojas y brotes. Para determinar diferencias significativas entre las concentraciones de fitohormona se utilizó una prueba Tukey con una significancia de 5%.

Tabla 5

Condiciones de tratamientos de fitohormona

Tratamientos	Cantidad de explantes por tratamiento	Variable Concentración de fitohormona (AIA)
T1	12	0,5 mg/L
T2	12	1 mg/ml
T3	12	1,5 mg/ml
T4 (Control negtivo)	12	-

Nota. El tratamiento es considerado como un control negativo por ausencia de fitohormona.

3. CAPITULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis y discusión de los resultados

3.2 Viabilidad de los explantes de *M. rhopaloides*

En este caso la contaminación y oxidación presentan una alta variabilidad en sus porcentajes pese a que todos los explantes fueron tratados y cultivados al mismo tiempo, siendo que a pesar de esta variabilidad el protocolo de desinfección resulto ser efectivo. Cabe recalcar que la contaminación y oxidación son características que se miden de manera cualitativa por ausencia o presencia de esta.

Mientras que la contaminación en T1 es alta de 58,33% el mayor porcentaje de oxidación está representado por un 25% en el tratamiento 2 (T2), esto representa una disminución considerable en explantes viables y que sean capaces de desarrollar organogénesis.

3.2.1 Protocolo de desinfección

El protocolo de desinfección fue modificado inesperadamente por la presencia inicial de una alta contaminación durante el desarrollo de este estudio experimental, esto debido a la falta de material bibliográfico en el cual basarse para esta especie en específico. Estudios realizados por **Chávez y Duy, (2024)** presentan el uso de un protocolo básico, que no controló de manera correcta la presencia de contaminación, resultando en que los primeros ensayos del protocolo presenten muy alta contaminación, que por sus características físicas es posible denominarlo como un hongo.

Para combatir esta contaminación se hicieron uso de estudios realizados por **Cárdenas, (2015)**, en los cuales se presenta un protocolo utilizado en dos especies *Paulownia fortunei* y *P.elongata*, las cuales poseen características leñosas y también un alto valor para la industria maderera.

Estos estudios presentan el uso de diferentes compuestos químicos de desinfección de los cuales se usó PHYTON un antifúngico basado en la actividad de los iones de cobre sobre los microorganismos más comunes en tejidos vegetales **(SERFI, 2020).**

Otro de los factores que tienen un efecto importante dentro de los elementos del protocolo para la desinfección es el hipoclorito de sodio (NaOCl), que se ha usado ampliamente de manera eficaz en la micropropagación *in vitro* para la desinfección de explantes, empleado de manera general como agente antimicrobiano ajustado a las concentraciones adecuadas, evitando posibles efectos de fitotoxicidad que puedan comprometer la viabilidad de los explantes **(Díaz et al., 2023)**.

La combinación entre el antifúngico PHYTON® y el hipoclorito de sodio es un enfoque eficaz según **Gándara et al., (2023)** donde se define que los protocolos que implementan antifúngicos a base de cobre potencia la eficacia de la desinfección en las especies leñosas, favoreciendo también a la reducción de la oxidación, debido a que las especies leñosas presentan un alto porcentaje de producción de compuestos fenólicos durante el procesamiento y corte de los explantes, logrando estabilizar los compuestos reduciendo la oxidación de las plantas.

En la Tabla 6 es posible observar los resultados de la viabilidad de los explantes y sus variables de respuesta final posterior a las 7 semanas de su incubación.

Tabla 6

Porcentajes de contaminación, oxidación y viabilidad de los explantes de Myrcianthes rhopaloides con el protocolo de desinfección propuesto.

Tratamientos	Contaminados	Oxidados	Viables
T1	58,33%	16,67%	25,00%
T2	25,00%	25,00%	50,00%
T3	25,00%	8,33%	66,67%
T4	41,67%	16,67%	41,67%

Nota. En los 4 tratamientos se aplicó el mismo tipo de protocolo de desinfección con hipoclorito de sodio al 2% y antifúngico PHYTON al 1%.

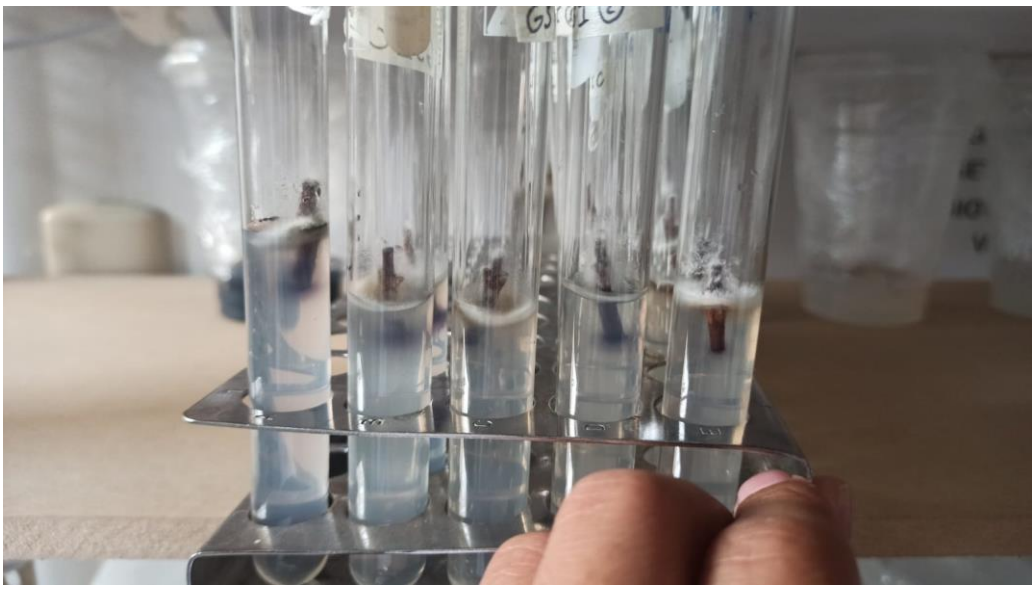
Las modificaciones que se aplicaron al protocolo son las que permitieron obtener un porcentaje de viabilidad significativo, por lo cual, el realizar ensayos preliminares es óptimo para el desarrollo de técnicas, protocolos y métodos específicos de desinfección para especies, dando la posibilidad a que estos protocolos especializados permitan la obtención de un mayor porcentaje de viabilidad en la supervivencia de explantes.

3.2.2 Contaminación

En la Figura 6 es posible observar la presencia de contaminación en los explantes, siendo que este tipo de contaminación se muestra recurrente y que aparenta ser la misma en todas las unidades experimentales contaminadas, especulamos que es una contaminación endógena tambien llamada endófita.

Figura 6

Explantes con presencia de contaminación



Nota. Es posible observar como la contaminación posee la misma apariencia extendiéndose como punto de partida desde la parte superior del explante hasta dar con el medio

La contaminación endógena representa un problema común que es crítico para el éxito de la micropropagación *in vitro* en especial para especies leñosas, esta se caracteriza por ser difícil de eliminar debido a estar localizada dentro de los tejidos vegetales de la misma planta; lo cual se puede atribuir a microorganismos latentes que se desarrollan en condiciones de cultivo que sean favorables **(Kumari et al., 2023)**.

Este problema tiende a incrementar sus probabilidades de presentarse cuando las especies vegetales son de un origen ambiental natural o salvaje, debido a que el espécimen está expuesto a un ambiente enteramente aleatorio, complejo y de enorme diversidad **(Okoroafor, 2022)**.

Esta contaminación también llega a afectar o alterar las condiciones originales del medio de cultivo alterando el pH, provocando incluso la degradación de los nutrientes. **Chaudhary et al., (2022)** sugieren que para mitigar la contaminación endófita y sus efectos es necesario utilizar tanto fungicidas como bactericidas en un protocolo secuencial además de antibióticos de ser necesario para las especies leñosas; mientras que otros como **Romadanova et al., (2022**) recomiendan el uso de PPM™ (Plant Preservative Mixture) un bactericida que previene el crecimiento de bacterias y hongos que es inofensivo para la planta pero extremadamente especifico y selectivo.

En este caso se puede dar la posibilidad de ser una contaminación endófita debido a que el espécimen a pesar de que al momento de su recolección no muestra visiblemente signos o síntomas que adviertan de la presencia del microorganismo que al parecer se encuentra latente, otra dificultad de esta latencia que se presentó es, que a pesar de tener un protocolo con presencia de antifúngico, el desarrollo del posible hongo; este hongo ve disminuida la velocidad de contaminación pero no lo elimina por completo lo que provoca que el explante se desarrolle pero que tambien desarrolle la infección por el hongo como es visible en la Figura 7.

Figura 7

Explante con división celular y presencia de contaminación endógena



Nota. Este explante presentó contaminación posterior a las semanas de monitoreo y recolección de datos.

Otra posible explicación de esto es una posible relación simbiótica no investigada entre esta infección endófita y *M. rhopaloides*, saber qué tipo de hongo es el que provoca la infección requiere de un estudio diferente enfocado en la caracterización a partir de un testeo por PCR y análisis del hongo completo **(Montañez et al., 2024).**

Existe otro tipo de contaminación, alejada de la endógena o endófita es la exógena aquella que se encuentra fuera del tejido vegetal y se considera; como contaminación ambiental; donde la causa más próxima es al momento del transferir los explantes de su desinfección previa a ingresar a la cámara de flujo así como puede deberse a la misma cámara de flujo usada, a causa de la falta de mantenimiento del equipo donde los filtros HEPA son un valor crítico y se deben limpiar y/o reemplazar de manera regular **(Ouyang et al., 2023) (Gammoudi et al., 2022).**

Cabe recalcar que para minimizar las fuentes y posibles causas de contaminación los medios de cultivo; posterior a la dosificación de los medios de cultivo se dejaron en incubación por un periodo de tiempo de 7 días para descartar la contaminación causada por el usuario.

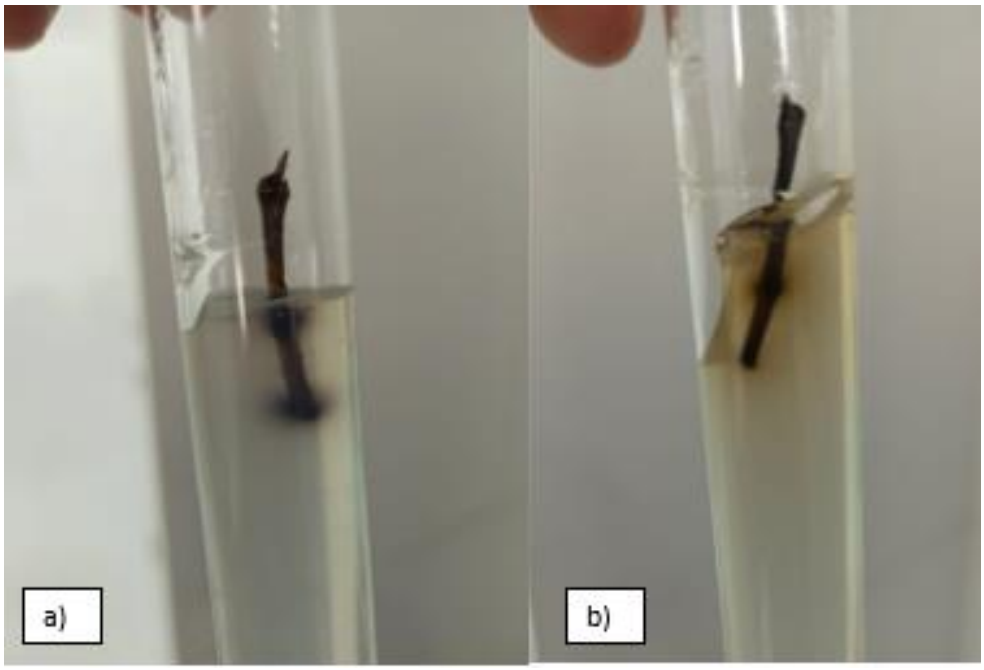
3.2.3 Oxidación

Los explantes presentan desde una leve oxidación como es visible en la Figura 6, donde en la base del explante que está en contacto con el medio de cultivo, se hace presente una nube, de tonalidad oscura pero difuminada, este fenómeno tiene que ver con la fisiología de los explantes debido a que es una reacción del tejido vegetal al ser expuesto a algún tipo de estrés **(Mansoor et al., 2022)**.

Para este caso en específico la oxidación o fenolización es provocada en una alta posibilidad a los cortes realizados al momento de procesar las muestras vegetales para obtener los explantes así como la exposición a los químicos desinfectantes utilizados para eliminar posibles contaminantes de los explantes, esta oxidación es provocada por la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) de manera desequilibrada que si llegan a ser excesivos provocan una necrosis como se puede observar en la Figura 8a) incluso un daño irreversible que termina por interrumpir por completo el desarrollo del explante.

Figura 8

Explantes con presencia de oxidación y necrosis

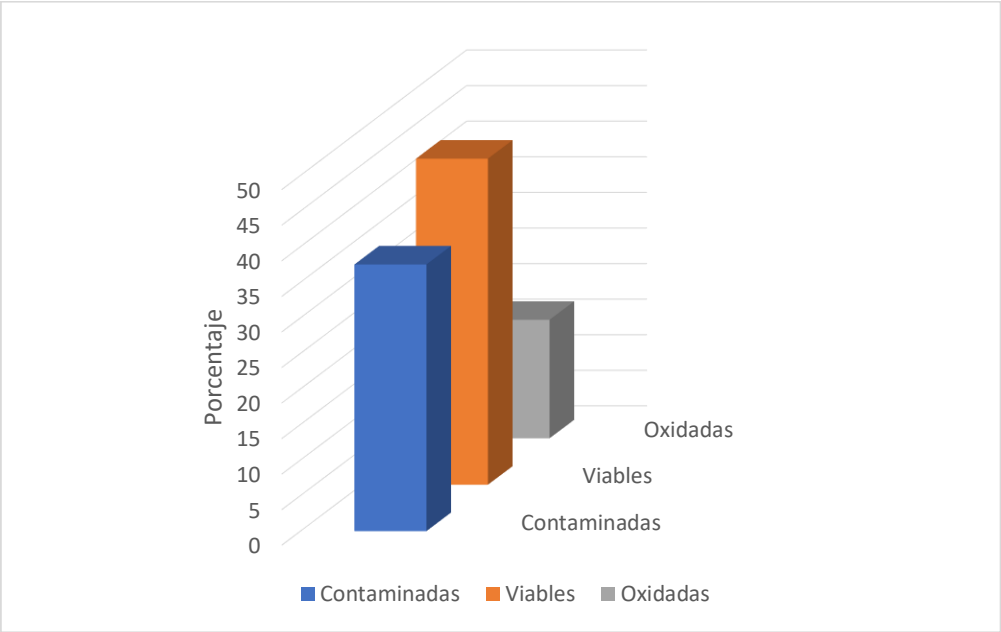


Nota. La necrosis del tejido vegetal se ve reflejada en la coloración del explante la cual pasa de una tonalidad verde a un color negro completo.

La oxidación por lo general está sujeta siempre a la presencia de un cambio de coloración en el medio de cultivo, en la Figura 8a) se ve una tonalidad oscura rodeada de una nube opaca pero difusa mientras que 8b) de la misma figura indica un cambio de coloración un tanto rojiza marrón, este cambio de coloración se debe a la interacción de los ROS y otros compuestos fenólicos de las reacciones metabólicas del explante con los componentes del medio de cultivo e incluso la fitohormona presente en el medio de cultivo **(Aazami et al., 2021).**

Figura 9

Porcentaje de contaminación, oxidación y viabilidad



Nota. Los explantes oxidados representan el menor porcentaje de explantes no viables.

La oxidación puede ser exitosamente disminuida mediante la suplementación del medio de cultivo o el uso de compuestos que permitan la reducción de la liberación de ROS como por ejemplo el ácido cítrico y ascórbico son considerados antioxidantes que pueden inhibir la oxidación o retardarla, y se pueden sumergir los explantes en una solución de estos compuestos para realizar los cortes asi evitando la oxidación, pero para realizar esto se debe tomar en cuenta la especie a la cual se le va a aplicar este tratamiento porque el exceso de cualquiera puede causar fitotoxicidad **(Salazar y Reyes, 2024).**

Existe una variedad de estudios acerca de la reproducción por micropropagación *in vitro* de especies leñosas y maderables como los estudios de **Salazar y Reyes, (2024)** en los cuales trabaja con la especie *S. macrophylla* comúnmente conocida como caoba donde su protocolo de desinfección utiliza un ajuste de concentraciones diferente con NaOCl al 3% por 10 minutos; esto recalca la importancia de dar seguimiento e investigación a como una especie reacciona de manera específica a un protocolo, en especial con especies de las cuales no se tiene ningún tipo de conocimiento o protocolos consistentes, efectivos y estandarizados para lograr el máximo de explantes viables y reducir tanto la contaminación como la oxidación de los mismos para asegurar el correcto desarrollo del espécimen.

Por otra parte, la mejor forma más común de contrarrestar el problema de la contaminación endógena o endófita es el utilizar plantas o especímenes que provengan de un entorno controlado como un invernadero donde se hayan tratado previamente y administrados compuestos que permitan la eliminación de este tipo de microorganismos, teniendo en cuenta la especie necesidades y bajo investigaciones de cómo se desarrollará al momento de su aclimatación **(Permadi et al., 2024).**

3.3 Análisis de los efectos de las concentraciones de ácido indol 3 acético para inducir división celular *in vitro*.

En la Tabla 7 se aprecian los resultados obtenidos de las variables de respuesta máxima después de siete semanas de monitoreo siendo el número de hojas, la longitud del brote y el número de brotes que presenta los explantes a partir de la aplicación de tres diferentes concentraciones de ácido indol -3-acético.

Tabla 7

Resultados máximos de los efectos de las concentraciones de fitohormona por semana

	Semana 3			Semana 5			Semana 7		
Tratamientos	**N° Hojas**	**N° de Brotes**	**Longitud de Brotes (mm)**	**N° Hojas**	**N° Brotes**	**Longitud de Brotes (mm)**	**N°de Hojas**	**N° de Brotes**	**Longitud de Brotes**
T1	0	0,1	1	1	1	0,5	1	2	1,8
T2	1	1	1,5	2	2	2,5	2	2	4,5
T3	1	1	2	4	2	6,7	8	2	9,7
T4	0	0	0	0	0	0	2	1	2

Nota. T4 es el control negativo debido que a que no posee presencia de fitohormona, los valores son los especímenes con el máximo de crecimiento por cada tratamiento.

Como se puede observar en la Tabla 7 el tratamiento que muestra una mayor estimulación de división celular en términos de organogénesis representada por el crecimiento de brotes y hojas es el tratamiento 3 (T3), mostrando también una disminución en el tiempo de desarrollo, este tratamiento presenta una media de 6,39 mm de longitud y un máximo crecimiento de 8 hojas y 2 brotes; mientras que el tratamiento 1 exhibe la menor capacidad para estimular la división celular con una media de longitud de 2,23 mm y un mínimo crecimiento de 1 hoja y dos brotes. Por otra parte, los explantes del control negativo no presentan un crecimiento tan exponencial siendo casi mínimo y también en un periodo de tiempo más largo, siendo posible observar como el tratamiento de control con ausencia de fitohormona muestra rasgos de división celular apenas en la séptima semana de haber iniciado su cultivo.

Figura 10

Explantes a los que se les aplicó los tratamientos



Nota. Tratamientos nombrados a partir del medio de cultivo y la concentración de fitohormona en el medio

Figura 11

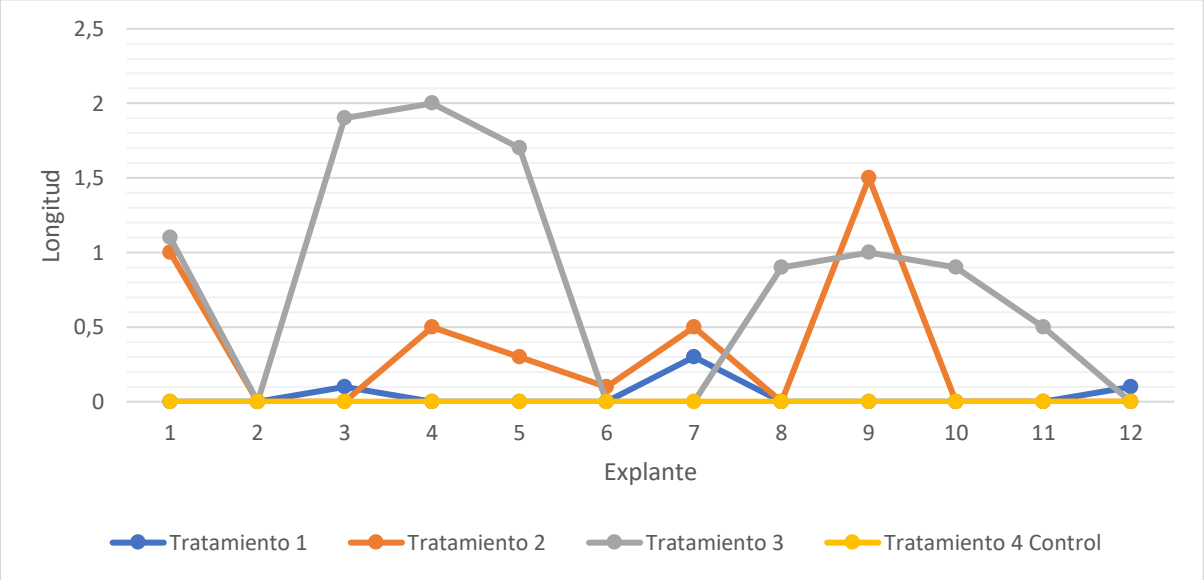
Explantes con división celular en forma de organogénesis



Nota. Estos son explantes viables que presentan un óptimo desarrollo de brotes y hojas y coloración sin presentar oxidación.

Figura 12

Evolución de la longitud de los brotes de los explantes.



Nota. Longitud de los explantes desarrollada por los brotes en la tercera semana de monitoreo.

En un periodo de tres, cinco y siete semanas se registraron resultados correspondientes a una respuesta positiva en los tratamientos con fitohormonas. Se fue testigo de un alto crecimiento en hojas y brotes de manera progresiva con el paso del tiempo. Con un incremento a partir de la tercera semana donde se comienza a visualizar crecimiento en los explantes donde se puede observar en la Figura 12 como sobresale el tratamiento 3 (T3) el cual usa una concentración de 1,5 mg/L de ácido indo-3-acético. El desarrollo que presenta el tratamiento T3 es significativo, en especial si se lo compara con el tratamiento 4 (T4) el cual es el tratamiento de control que no presenta fitohormona alguna lo cual hace que los otros tratamientos sean relevantes ante la respuesta del explante a la presencia de fitohormona en el medio.

Gráficas similares se encuentran en los Anexos 9,10 y 11, estos gráficos están enfocados en el desarrollo del crecimiento de hojas y brotes los cuales se llevaron a anexos debido a son repetitivos, con la muestra de uno de los gráficos por tiempo es posible exponer resultados positivos ante los tratamientos de fitohormona, sin embargo, estos resultados son explicados por parte de la prueba de análisis ANOVA y prueba Tukey.

Para determinar si hay una diferencia significativa real en los datos obtenidos se aplicó un análisis de varianza ANOVA junto a una prueba Tukey según las diferencias significativas. En la Tabla 8 es posible observar que los cuatro tratamientos presentan diferencias significativas en la longitud de brotes.

Tabla 8

Resultados obtenidos posterior al análisis Tukey

Multiple Comparison of Means - Tukey HSD, FWER=0.05						
group1	**group2**	**meandiff**	**p-adj**	**lower**	**upper**	**reject**
T1	**T2**	0.7683	0.79	1.4421	2.9788	False
T1	**T3**	3.7375	0.0003	1.5271	5.9479	True
T1	**T4**	-0.5583	0.9062	-2.7688	1.6521	False
T2	**T3**	2.9692	0.0045	0.7587	5.1796	True
T2	**T4**	-1.3267	0.3878	-3.5371	0.8838	False
T3	**T4**	-4.2958	0.0	-6.5063	-2.0854	True

Nota. Los valores se obtuvieron al igual que el análisis ANOVA con el uso de Colab.

En la Tabla 8 es posible observar los valores que se obtienen de la comparación los tratamientos en dos grupos para evaluar diferencias significativas con una significancia de 0,05; donde las columnas importantes son las de meandiff, p-adj y reject; donde meandif presenta la diferencia de medias entre los tratamientos, p-adj indica que si la diferencia es significativa si el valor es menor a 0,05 y el reject indica una respuesta clara a si existe diferencia entre tratamientos.

Al interpretar estos resultados queda claro que el tratamiento 3 presenta una diferencia significativa ante los tratamientos 1,2 y 4; donde la comparación entre T1 y T2 presenta una diferencia de medias de 0,7683 con un p-adj (p-ajustado) de 0,79 dando como resultado una respuesta de no significancia, es decir que entre los valores de T1 y T2 no hay diferencias significativas, este tipo de comparación el código insertado en Colab que se puede apreciar en el Anexo --, por otra parte los tratamientos T1,T2 y T4 al ser comparados no presentan diferencias significativas, en este caso el tratamiento 4 al ser un control sin presencia de fitohormona no va a dar valores significativas que compitan con los tratamientos de fitohormona AIA

Otras investigaciones han obtenido resultados acerca de la capacidad de la fitohormona AIA para inducir y estimular la capacidad de división celular en forma de organogénesis, este es el caso de los estudios realizados por **Delgado et al., (2023)** donde trabajan con la especie leñosa *Cederela odorata*

donde se estudia el desarrollo de plántulas de la especie tanto en germinación de semillas como de explantes y la viabilidad de los mismos, para este estudio se empleó un periodo de tiempo mucho más extenso para realizar las pruebas en un periodo de 12 meses y concentraciones más bajas pero que producen una reacción significativa en las variables de respuesta en el periodo de tiempo indicado.

La presencia de fitohormona, AIA en este caso, provoca una reacción de crecimiento y organogénesis, debido a que regula la elongación de tejido e incluso la formación de raíces, debido a que fomenta una respuesta de estrés, las concentraciones de ácido indol -3- acético que se aplica influye directamente a este crecimiento como ha sido observable y evaluado anteriormente.

El crecimiento causado por el ácido indol-3-ácetico ha quedado registrado de igual manera en estudios realizados por (Wang et al., 2024)donde es aplicado para la micropropagación de especies variadas de *Eucalyptus* que son pertenecientes a la misma familia de las Mirtáceas, mostrando que la mejor concentración para esta especie es de 1,5 mg/L de AIA para la formación de callos y organogénesis para la propagación clonal.

Este efecto es dependiente directamente de la especie a la que se está aplicando la fitohormona, es decir, que sus efecto van a varia de especie a especie, como se puede apreciar en un estudio publicado por **Jiménez et al., (2020)** donde se aplican concentraciones similares de la misma fitohormona AIA en la especie *Dahlia* sp donde la mayor reacción de división celular fue observada en el desarrollo de raíces de hasta 3,76 cm de longitud, esto deja en evidencia que este espécimen es más susceptible a estas concentraciones de AIA y nos deja en consideración que no todas las concentraciones usadas en otros estudios serán funcionales para la especie que se utiliza, incluso en las mismas especies leñosas.

Las concentraciones aplicadas y sus efectos son variables por especies, como sucede con *M. rhopaloides* donde a pesar de que la concentración de AIA es de 1,5 mg/L sus efectos se ven enormemente disminuidos por las características de esta especie, ya que a diferencia de a *Dahlia sp.*

M. rhopaloides tiene características diferentes en especial sus requerimientos nutricionales lo que hace que en este caso se desarrolle organogénesis de hojas y brotes, lo cual puede explicar por qué las concentraciones de fitohormona probablemente no abastecen lo suficiente como para presentar un desarrollo de un nivel más completo e incrementado comparable a las observaciones realizadas en los

estudios citados en los anteriores párrafos, donde la suplementación en otras especies leñosas con esta fitohormona AIA tiene efectos como la formación de enraizamiento y callogénesis de manera eficiente y viable.

Los resultados obtenidos en los análisis Tukey del número de hojas y del número de brotes, presentados en los Anexos 13 y 14, presentaron valores donde el tratamiento 3 representa un efecto igual de significativo como se observó en la interpretación de datos del Tukey de la longitud de los brotes, mostrando de igual manera que los tratamientos que presentan fitohormona AIA (T1,T2,T3).

4. CAPITULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- Con los resultados obtenidos después de valuados los efectos de los tratamientos de fitohormona AIA, es posible afirmar que la presencia de ácido indol-3-acético influye en el desarrollo de división celular de Arrayán negro (*M. rhopaloides*) provocando la organogénesis de tanto brotes como hojas ya que al compararse con los controles sin fitohormona estos presentan una división celular mucho más lenta de la cual hay evidencia apenas en la séptima semana mientras que los tratamientos con fitohormona ya tienen resultados positivos a partir de la semana 3.

- El protocolo de desinfección compuesto por jabón líquido por 15 minutos, antifúngico PHYTON® al 1% por 35 minutos e hipoclorito de sodio al 2% con dos gotas de Tween 20® por 20 minutos todo esto en agitación constante a 100 rpm aplicado a los explantes de *M. rhopaloides*, resultó ser eficiente para obtener una tasa de viabilidad moderada y supervivencia de explantes, ayudando a la reducción moderada de contaminación y bajo porcentaje de oxidación de los explantes.

- Al terminar de ensayar las concentraciones de los 3 tratamientos que presentan fitohormona siendo 0,5 mg/L; 1 mg/L y 1,5 mg/L; se concluye que la concentración de 1,5mg/L es la más adecuada para la estimulación de la división celular de los explantes de *M. rhopaloides*, obteniendo una longitud máxima de brote de 9,7 mm; presencia de dos brotes y con el desarrollo de 8 hojas sin presentar fitotoxicidad, esto abre la posibilidad de realizar ensayos con concentraciones más elevadas de AIA gradualmente.

4.2 Recomendaciones

- El tiempo es fundamental para el desarrollo de un protocolo definido y adecuado para la desinfección de explantes, por lo cual se recomienda tomar en cuenta realizar ensayos de diferentes protocolos para determinar el mejor protocolo de desinfección.

- Debido a las posibles contaminaciones provocadas por el ambiente también se recomienda que se realicen mantenimientos a los equipos como la cámara de flujo laminar en especial antes de utilizarla.

- Para disminuir la oxidación de los explantes se recomienda utilizar antioxidantes como el ácido cítrico y/o ascórbico.

5. Bibliografía

Aazami, M. A., Rasouli, F., & Ebrahimzadeh, A. (2021). Oxidative damage, antioxidant mechanism and gene expression in tomato responding to salinity stress under in vitro conditions and application of iron and zinc oxide nanoparticles on callus induction and plant regeneration. *BMC Plant Biology*, *21*(1), 1–23. https://doi.org/10.1186/s12870-021-03379-7

Aguilera, N., & Guedes, L. M. (2022). Manual de Técnicas Anatómicas e Histoquímicas para el Análisis de Muestras Vegetales. In *Universidad de Concepción*. https://www.researchgate.net/publication/359367105_2021-Manual_de_Tecnicas_Anatomicas_e_Histoquimicas_para_el_Analisis_de_Muestras_Vegetales

Albarran, J., & Fuenmayor, F. (2010). *Cultivo In Vitro de Células y Tejidos Vegetal | Intagri S.C.* Intagri. https://www.mendeley.com/catalogue/87970edc-08f7-3ab5-ba3d-6ed9ac0a3025/

Armijos, C., Valarezo, E., Cartuche, L., Zaragoza, T., Finzi, P. V., Mellerio, G. G., & Vidari, G. (2018). Chemical composition and antimicrobial activity of Myrcianthes fragrans essential oil, a natural aromatizer of the traditional Ecuadorian beverage colada morada. *Journal of Ethnopharmacology*, *225*, 319–326. https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.07.018

Azofeifa-Bolaños, J. B., Rivera-Coto, G., Paniagua-Vásquez, A., Cordero-Solórzano, R., & Salas-Alvarado, E. (2019). Disinfection effect of nodal segments from Vanilla planifolia Andrews on the morphogenetic response of in vitro plants. *Agronomia Mesoamericana*, *30*(1), 33–49. https://doi.org/10.15517/am.v30i1.32360

Azofeifa-Delgado, Á. (2008). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía Mesoamericana*, *20*(1), 153. https://doi.org/10.15517/am.v20i1.4990

Balero, A. V., Pérez, P. A. O., Rodríguez, L. G., & Rodríguez, N. V. (2002). Efecto de la fenolización sobre explantes de caña de azúcar (Saccharum spp . híbrido var . Sp 70-1284) en la formación de callos. *Biotechnology*, *2*(1), 31–36. https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/125

Bustamante, K., Rocha, S. P., Sharry, S. E., Guerra, M. P., & Niella, F. O. (2022). Organogénesis directa e indirecta a partir de segmentos nodales, hojas y raíces de Eugenia involucrata DC. *Revista de La Facultad de Agronomía*, *121*(Especial 2), 102. https://doi.org/10.24215/16699513e102

Cabrera Caisa, D. J., Chanaguano Lusintuña, J. D., Quinatoa Lozada, E. F., & Espinosa Cunuhay, K. A. (2024). Tipos de Injerto y fitohormonas en la propagación clonal del aguacate (Persea americana Mill) de la variedad Hass. *Revista Científica Kosmos*, *3*(2), 67–80. https://doi.org/10.62943/rck.v3n2.2024.99

Cárdenas, A. M. (2015). VALIDACIÓN Y DESARROLLO DE UNA TECNOLOGÍA PARA LA MULTIPLICACIÓN in vitro DE Paulownia elongata, Paulownia fortunei Y UN HÍBRIDO (P. fortunei x P. elongata) BAJO SISTEMAS DE PROPAGACIÓN CONVENCIONAL E

INMERSIÓN TEMPORAL. In *Tesis*. http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/8735

Chacón Campana, M. A., Ponce Aranibar, L. M., Muñiz Luna, S. B., Huaracha Quispe, D. P., & Flores-Huisa, K. (2021). Propagación in-vitro de cuatro especies de orquídeas nativas de la región Cusco. *Cantua*, *16*, 26–43. https://doi.org/10.51343/cantu.v16i0.630

Chaudhary, P., Agri, U., Chaudhary, A., Kumar, A., & Kumar, G. (2022). Endophytes and their potential in biotic stress management and crop production. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 13, p. 933017). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.933017

Cuenca Chávez, S. M., & Duy Sotamba, D. A. (2024). Evaluación de dos protocolos de micropropagación en Myrcianthes rhopaloides Kunth. *Publicación UPS*, 65. http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/27358

Delgado-Paredes, G. E., Vásquez-Díaz, C., Esquerre-Ibañez, B., Zuñe-Da Silva, F., Bazán-Sernaqué, P., & Rojas-Idrogo, C. (2023a). In vitro seed germination, micropropagation and germplasm conservation of Cedrela odorata (Meliaceae) in northern Peru. *Bosque*, *44*(1), 97–109. https://doi.org/10.4067/s0717-92002023000100097

Delgado-Paredes, G. E., Vásquez-Díaz, C., Esquerre-Ibañez, B., Zuñe-Da Silva, F., Bazán-Sernaqué, P., & Rojas-Idrogo, C. (2023b). In vitro seed germination, micropropagation and germplasm conservation of Cedrela odorata (Meliaceae) in northern Peru. *Bosque*, *44*(1), 97–109. https://doi.org/10.4067/s0717-92002023000100097

Díaz-Lezcano, M. I., Pereira-Báez, K. D., Brítez -Moreira, J. R., Mongelós-Franco, J. Y., & Mussi-Cataldi, C. E. (2023). Efecto de la concentración del hipoclorito de sodio sobre la contaminación y oxidación de meristemas en la micropropagación de banano. *Reportes Científicos de La FACEN*, *14*(2), 156–164. https://doi.org/10.18004/rcfacen.2023.14.2.156

Díaz Lezcano, M. I., Pereira Báez, K. D., Benítez Vera, S. G., Brítez Moreira, J. R., Alegre, C. E., Duarte Ovejero, N. N., Mongelós Franco, J. Y., Mussi Cataldi, C. E., & Batte Martínez, H. D. (2021). Identificación de agentes causales de la contaminación microbiana durante la micropropagación de Musa spp. *Steviana*, *13*(2), 20–27. https://doi.org/10.56152/stevianafacenv13n2a2_2021

Díaz Lezcano, M. I., Quiroz, M. I., Espínola, V., Britos, M. J., & Romero, J. A. (2023). Tiempo de inmersión en hipoclorito de sodio en la desinfección de meristemas de banano para su propagación clonal. *Revista de Investigación Científica y Tecnológica*, *7*(1), 131–139. https://doi.org/10.36003/rev.investig.cient.tecnol.v7n1(2023)10

Díaz Lezcano, M. I., Vera Arza, D. M., Gonzalez Espinola, D. D., & López Talavera, C. A. (2021). Micropropagación de Handroanthus heptaphyllus (VELL.) Mattos a partir de segmentos nodales. *Revista de La Sociedad Científica Del Paraguay*, *26*(1), 49–63. https://doi.org/10.32480/rscp.2021.26.1.49

Duffau, M. E. V., & Guachimboza, P. K. C. (2020, July 1). Gobernanza ambiental, Buen Vivir y la evolución de la deforestación en Ecuador en las provincias de Tungurahua y Pastaza. *FORO*.

Revista de Derecho, 146–167. https://doi.org/10.32719/26312484.2020.34.8

EcuRed. (2023). *Medio de cultivo de Gamborg (B5)*. 2023. https://www.ecured.cu/Medio_de_cultivo_de_Gamborg_%28B5%29?utm_source=chatgpt.com

Gammoudi, N., Nagaz, K., & Ferchichi, A. (2022). Establishment of optimized in vitro disinfection protocol of Pistacia vera L. explants mediated a computational approach: multilayer perceptron–multi−objective genetic algorithm. *BMC Plant Biology*, *22*(1), 1–13. https://doi.org/10.1186/s12870-022-03674-x

Gándara-Ledezma, V., Tineo-Garcíia, L., Castro-Espinoza, L., Ruiz-Cruz, S., Márquez-Cervantes, A., Coronado, M. A. G., & others. (2023). Desinfección de foliolos de nogal pecanero adulto Carya illinoinensis (Wangenh.) K. Koch.(Juglandaceae) e inducción de callogénesis in vitro. *POLIBOTÁNICA*, *55*, 30. https://doi.org/10.18387/polibotanica.55.9

Gopu, C., Chakilam, C. S., Chirumamilla, P., Vankudoth, S., & Taduri, S. (2020). Rapid in vitro adventitious rooting and proliferation by leaf and nodal cultures of momordica cymbalaria fenzl. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, *8*(2), 103–107. https://doi.org/10.7324/JABB.2020.80217

Greim, H. (2023). Ethanol. In *Encyclopedia of Toxicology, Fourth Edition: Volume 1-9* (Vol. 4, pp. V4-407-V4-412). StatPearls Publishing. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824315-2.00775-2

Harutyunyan, Z. E., Vardanian, I. V., Hoveyan, Z. H., Avagyan, A. E., & Hakobyan, A. H. (2022). Biotechnology methods in study of Vaccinium uliginosum L. and Vaccinium myrtillus L. in Armenia. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *1045*(1), 012149. https://doi.org/10.1088/1755-1315/1045/1/012149

Hasnain, A., Naqvi, S. A. H., Ayesha, S. I., Khalid, F., Ellahi, M., Iqbal, S., Hassan, M. Z., Abbas, A., Adamski, R., Markowska, D., Baazeem, A., Mustafa, G., Moustafa, M., Hasan, M. E., & Abdelhamid, M. M. A. (2022). Plants in vitro propagation with its applications in food, pharmaceuticals and cosmetic industries; current scenario and future approaches. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 13, p. 1009395). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1009395

Hernández, R., Palma, J., Abreu, A., Herrera, M., & Herrera, R. (2023). Evaluación del efecto de la desinfección de explantes del pasto Cuba CT-115 con hipoclorito de sodio. Nota técnica. *Cuban Journal of Agricultural Science*, *57*(1), 1–15. http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S2079-34802023000100005&script=sci_arttext&tlng=es

Indacochea, B., Parrales, J., Hernández, A., Castro, C., Vera, M., Zhindón, A., & Gabriel, J. (2018). Evaluación de medios de cultivo in vitro para especies forestales nativas en peligro de extinción en Ecuador. *Agronomía Costarricense*, *42*(1), 63–89. https://doi.org/10.15517/rac.v42i1.32203

Jadid, N., Anggraeni, S., Ramadani, M. R. N., Arieny, M., & Mas'ud, F. (2024). In vitro propagation of Indonesian stevia (Stevia rebaudiana) genotype using axenic nodal segments. *BMC Research Notes*, *17*(1). https://doi.org/10.1186/s13104-024-06703-0

Jiménez-Mariña, L., Fonseca-Arias, M., García-Alcántara, A., & Vázquez-Rodríguez, J. (2020). Efecto de diferentes concentraciones de Ácido Indolacético (AIA) en el enraizamiento in vitro de Dahlia sp Sucel Infante-Fonseca 1. In *Cultivos Tropicales* (Vol. 40, Issue 1). https://ediciones.inca.edu.cu/index.php/ediciones/article/view/1500

Jones, I. A., & Joshi, L. T. (2021). Biocide use in the antimicrobial era: A review. In *Molecules* (Vol. 26, Issue 8). Molecules. https://doi.org/10.3390/molecules26082276

Karakeçili, A., Korpayev, S., Dumanoğlu, H., & Alizadeh, S. (2019). Synthesis of indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid loaded zinc oxide nanoparticles: Effects on rhizogenesis. *Journal of Biotechnology*, *303*, 8–15. https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2019.07.004

Kumari, P., Deepa, N., Trivedi, P. K., Singh, B. K., Srivastava, V., & Singh, A. (2023). Plants and endophytes interaction: a "secret wedlock" for sustainable biosynthesis of pharmaceutically important secondary metabolites. In *Microbial Cell Factories* (Vol. 22, Issue 1, pp. 1–19). BioMed Central. https://doi.org/10.1186/s12934-023-02234-8

Layza, J. R., Gonzales-Arteaga, J. J., Romero-Rivas, L. C., & Párraga-Quintanilla, A. (2021). Establecimiento in vitro de café var. caturra roja a partir de microesquejes. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, *5*(5), 8132–8148. https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v5i5.894

Mansoor, S., Wani, O. A., Lone, J. K., Manhas, S., Kour, N., Alam, P., Ahmad, A., & Ahmad, P. (2022). Reactive Oxygen Species in Plants: From Source to Sink. In *Antioxidants* (Vol. 11, Issue 2, p. 14). Antioxidants (Basel). https://doi.org/10.3390/antiox11020225

Meneses, L. S., Morillo, L. E., & Vásquez-Castillo, W. (2022). In vitro propagation of Vaccinium floribundum Kunth from seeds: promissory technology for mortiño accelerated production. *Canadian Journal of Plant Science*, *102*(1), 216–224. https://doi.org/10.1139/cjps-2020-0290

Middelhoff, F., & Peselmann, A. (2023). The Stories Plants Tell An Introduction to Vegetal Narrative Cultures. *Narrative Culture*, *10*(2), 175–188. https://doi.org/10.1353/ncu.2023.a903843

Mollohuanca, C., Bustamante, E., Mayta, L., & Bardales, R. (2022). In vitro rooting and the influence of four types of substrates on the acclimatization of Queñoa Polylepis rugulosa Bitter. *Manglar*, *19*(1), 25–32. https://doi.org/10.17268/manglar.2022.003

Mongelós Franco, Y., Mussi-Cataldi, C., Duarte-Ovejero, N., & Díaz-Lezcano, M. (2020). Protocolo de desinfección para establecimiento in vitro de meristema apical de banano Musa spp. *Cedamaz*, *10*(2), 47–50. https://revistas.unl.edu.ec/index.php/cedamaz/article/view/815%0Ahttps://revistas.unl.edu.ec/index.php/cedamaz/article/view/815

Montañez-De Azcué, D., Cristóbal-Alejo, J., Uc-Várguez, A., Moo-Koh, F. A., & Tun Suárez, J. M. (2024). Efecto antifúngico in vitro de hongos endófitos de cucurbitáceas criollas de Yucatán. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, *11*(2). https://doi.org/10.19136/era.a11n2.3992

Nikoloff, N., Sharry, S., Adema, M., & Abedini, W. (2020). No siempre sale todo bien. Problemas de cultivo de tejidos vegetales. In *Plantas de probeta: Manual para la propagación de plantas por*

cultivo de tejidos in vitro (pp. 112–120). Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Veterinarias. https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/109814

Okoroafor, U. E. (2022). Microbial Contamination in Plant Tissue Culture and Elimination Strategies. *Nigerian Agricultural Journal*, *53*(2), 348–355. http://dx.doi.org/10.1007/0-306-48099-9_12

Ordoñez Posadas, F., Martínez- Cárdenas, M. de L., & Rodríguez de la O, J. L. (2022). Germinación y multiplicación de plantas in vitro DE Heimia salicifolia (LYTHRACEAE). *Polibotánica*, *54*, 123–138. https://doi.org/10.18387/polibotanica.54.8

Orellana Carrión, M. A., Calderón Carvajal, D., & Torres, M. de L. (2024). El cultivo in vitro de plantas y su aporte en la agricultura local. *Esferas*, *5*, 151–163. https://doi.org/10.18272/esferas.v5i1.3137

Ouyang, X., Wang, Q., Li, X., Zhang, T., & Rastogi, S. (2023). Laminar airflow ventilation systems in orthopaedic operating room do not prevent surgical site infections: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, *18*(1). https://doi.org/10.1186/S13018-023-03992-2

Pereira, S. S. P., de Oliveira, H. M., Turrini, R. N. T., & Lacerda, R. A. (2015). Disinfection with sodium hypochlorite in hospital environmental surfaces in the reduction of contamination and infection prevention: A systematic review. In *Revista da Escola de Enfermagem* (Vol. 49, Issue 4, pp. 675–681). Rev Esc Enferm USP. https://doi.org/10.1590/S0080-623420150000400020

Permadi, N., Akbari, S. I., Prismantoro, D., Indriyani, N. N., Nurzaman, M., Alhasnawi, A. N., Doni, F., & Julaeha, E. (2024). Traditional and next-generation methods for browning control in plant tissue culture: Current insights and future directions. In *Current Plant Biology* (Vol. 38, p. 100339). Elsevier. https://doi.org/10.1016/j.cpb.2024.100339

Plantigen HIMEDIA. (2017). *Gamborg B5 Medium With Calcium Chloride, Vitamins and Sucrose Without Agar Product Code: PT016 Please refer disclaimer overleaf*. https://www.himedialabs.com/us/pt016-gamborg-b5-medium-w-cacl-vitamins-sucrose-w-o-agar.html

Proença, C., Faria, J., Oliveira, M., Staggemeier, V., Farias, A., & Oliveira, J. (2023). Myrcianthes (Myrtaceae) revisited: a new species, a new synonym, a lectotypification and an overview of its wood anatomy. *Phytotaxa*, *625*(1), 88–97. https://doi.org/10.11646/phytotaxa.625.1.6

Quinn, S. D., Dresser, L., Graham, S. P., Miller, L. M., Schaefer, C., Conteduca, D., Johnson, S., & Leake, M. C. (2022). Tween-20 Induces the Structural Remodeling of Single Lipid Vesicles. *Journal of Physical Chemistry Letters*, *13*(23), 5341–5350. https://doi.org/10.1021/acs.jpclett.2c00704

Quishipi, W. A. Z. (2022). Descripción anatómica de la madera de tres especies forestales procedentes del cantón Chunchi provincia de Chimborazo. *ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO*, *2465-DBRA-UTP-2022*, 86.

Romadanova, N. V., Tolegen, A. B., Kushnarenko, S. V., Zholdybayeva, E. V., & Bettoni, J. C. (2022). Effect of Plant Preservative MixtureTM on Endophytic Bacteria Eradication from In Vitro-Grown

Apple Shoots. *Plants*, *11*(19), 2624. https://doi.org/10.3390/plants11192624

Romero Alves, M. E. (2018). Aplicación del cultivo de tejidos in vitro (CTV) para la propagación de especies leñosas. *Revista Investigaciones Altoandinas*, *1*(1), 1–58. http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/69720

Salazar Guerra, G. L., & Reyes Morán, G. I. (2024). Establecimiento de un protocolo de cultivo IN VITRO de SWIETENIA MACROPHYLLA a través de Callogénesis inducida para promover su conservación en el Ecuador. *UPS*, 84. https://doi.org/GT005160

SERFI. (2020). *Phyton 27 ® : un fungicida preventivo , curativo y eficaz contra Lasiodiplodia*. 1–7. https://redagricola.com/phyton-27-un-fungicida-preventivo-curativo-y-eficaz-contra-lasiodiplodia/?utm_source=chatgpt.com

Silva Carrero, D. A., Matulevich Peláez, J. A., & Devia Castillo, B. O. (2016). Composición química del aceite esencial de hojas de Myrcianthes rhopaloides (Kunt) MCVAUGH (Myrtaceae). *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, *12*(1), 84–91. https://doi.org/10.18359/rfcb.1857

Toro de la Cruz, F., Gutiérrez Mora, A., & Plaza Ávila, A. P. (2021). *Manual de Prácticas de Laboratorio para la Micropropagación de Plantas* (Vol. 1). www.ciatej.mx

Torres-Chati, J., León-Quispe, J., & Tomas-Chota, G. (2017). Artículo original Actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de hojas de Luma chequen (Molina) A. Gray "arrayán" frente a patógenos de origen clínico. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, *37*, 10–16.

Uvidia, K., Salazar, L., & Bonilla-Bedoya, S. (2022). Caracterización de fragmentos de bosque montano en un escenario de transición urbana. *CienciAmérica*, *11*(2), 1–18. https://doi.org/10.33210/ca.v11i2.396

Volk, G. (2020). Introduction of Clean Plants into Tissue Culture: Temperate Crops. *Training in Plant Genetic Resources: Cryopreservation of Clonal Propagules*.

Wang, Y., Wu, Z., Li, X., & Shang, X. (2024). Regeneration and Genetic Transformation in Eucalyptus Species, Current Research and Future Perspectives. In *Plants* (Vol. 13, Issue 20, p. 2843). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). https://doi.org/10.3390/plants13202843

Zaldua, R. (2024). *Comparación de protocolos de desinfección y propagación para la especie vegetal Baccharis latifolia con el uso de yemas axilares*. http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/26940

6. ANEXOS

Anexo 1.

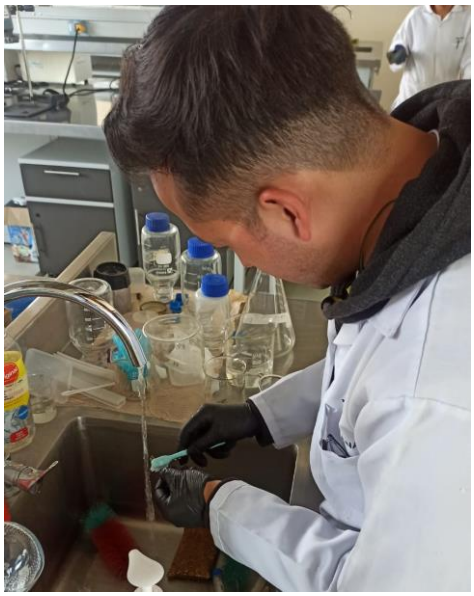
Eliminación de hojas de las muestras vegetales de M. rhopaloides



Nota. Este preprocesamiento del material vegetal puede realizarse dentro de la cámara de flujo, o en una zona desinfectada en presencia de la flama de un mechero bunsen o de una lampara de alcohol.

Anexo 2.

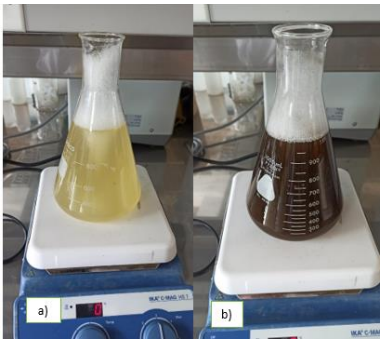
Desinfección previa de los explantes



Nota. Los explantes fueron cepillados de manera delicada para eliminar restos de suciedades incrustadas y otros contaminantes

Anexo 3.

Preparación de las soluciones de desinfección



Nota. La solución a) corresponde a la de jabón líquido mientras que la b) es la solución desarrollada a partir del antifúngico PHYTON.

Anexo 4.

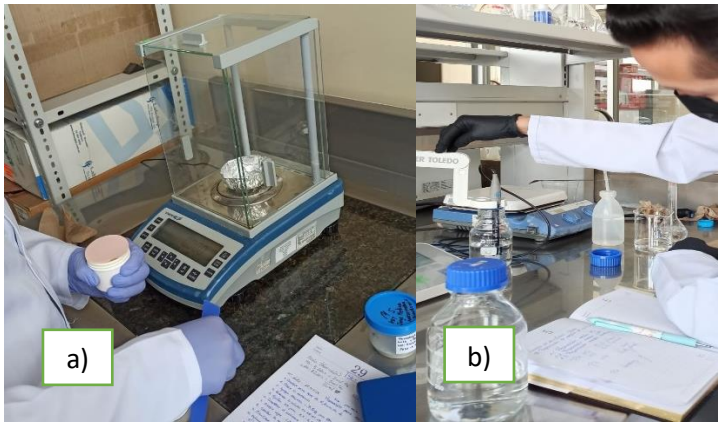
Desinfección de explantes sumergidos en agitación constante



Nota. Los explantes fueron sometidos a los agentes desinfectantes durante los periodos de tiempo establecidos

Anexo 5.

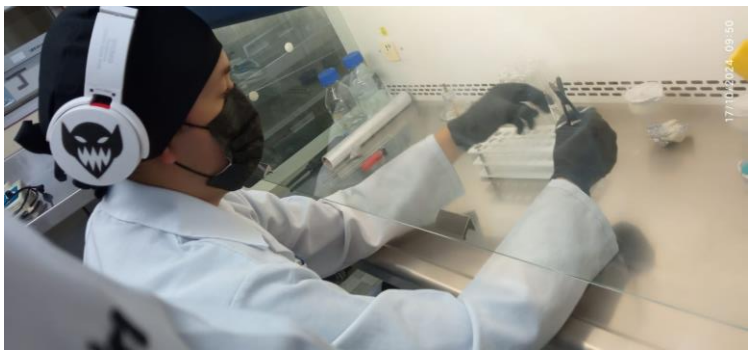
Preparación de medios de cultivo y rectificación de pH



Nota. La imagen a) corresponde al pesaje de componentes del medio de cultivo y la imagen b) corresponde a la rectificación del pH del medio de cultivo

Anexo 6.

Dosificación de medios de cultivo y rectificación de pH



Nota. Los medios de cultivo se dosificaron en tubos de ensayo, 12 a 15 ml por tubo

Anexo 6.

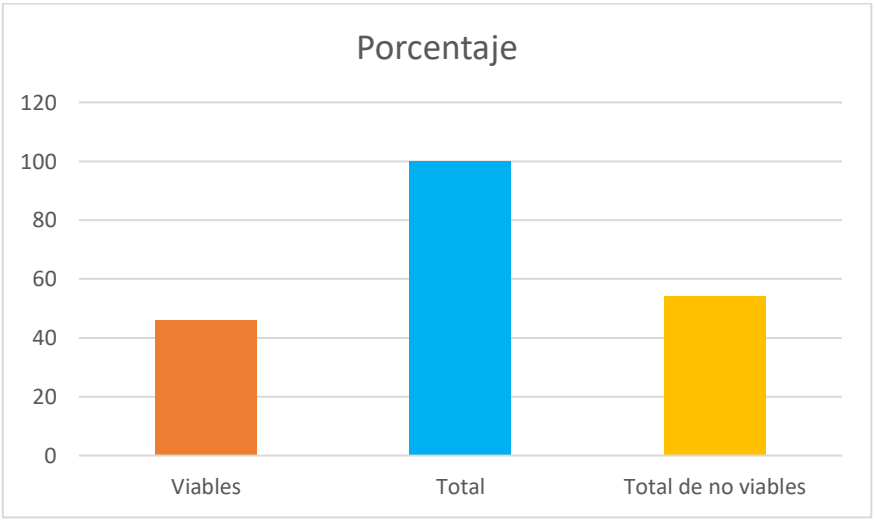
Siembra in vitro de los explantes en los tubos de ensayo



Nota. Proceso realizado posterior a la preparación y dosificación del medio de cultivo y la desinfección de los explantes.

Anexo 7.

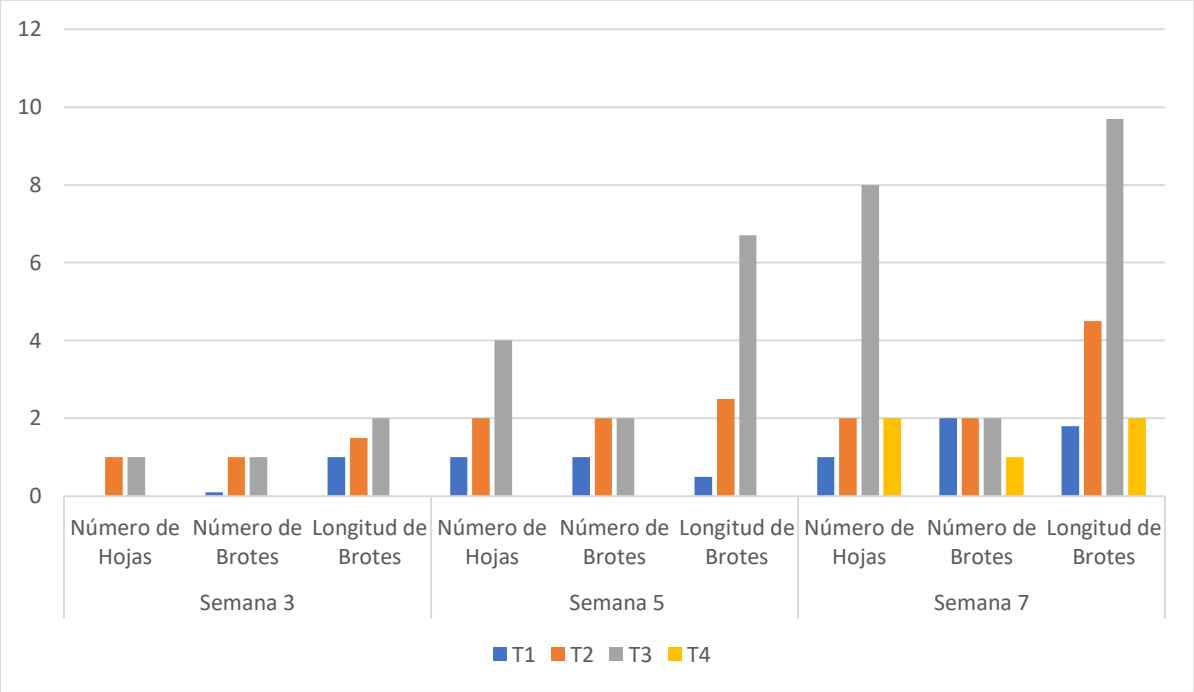
Porcentaje de explantes viables comparados al total de explantes.



Nota. El porcentaje de viabilidad es levemente inferior al de explantes no viables en relación al total del número de explantes realizado.

Anexo 8.

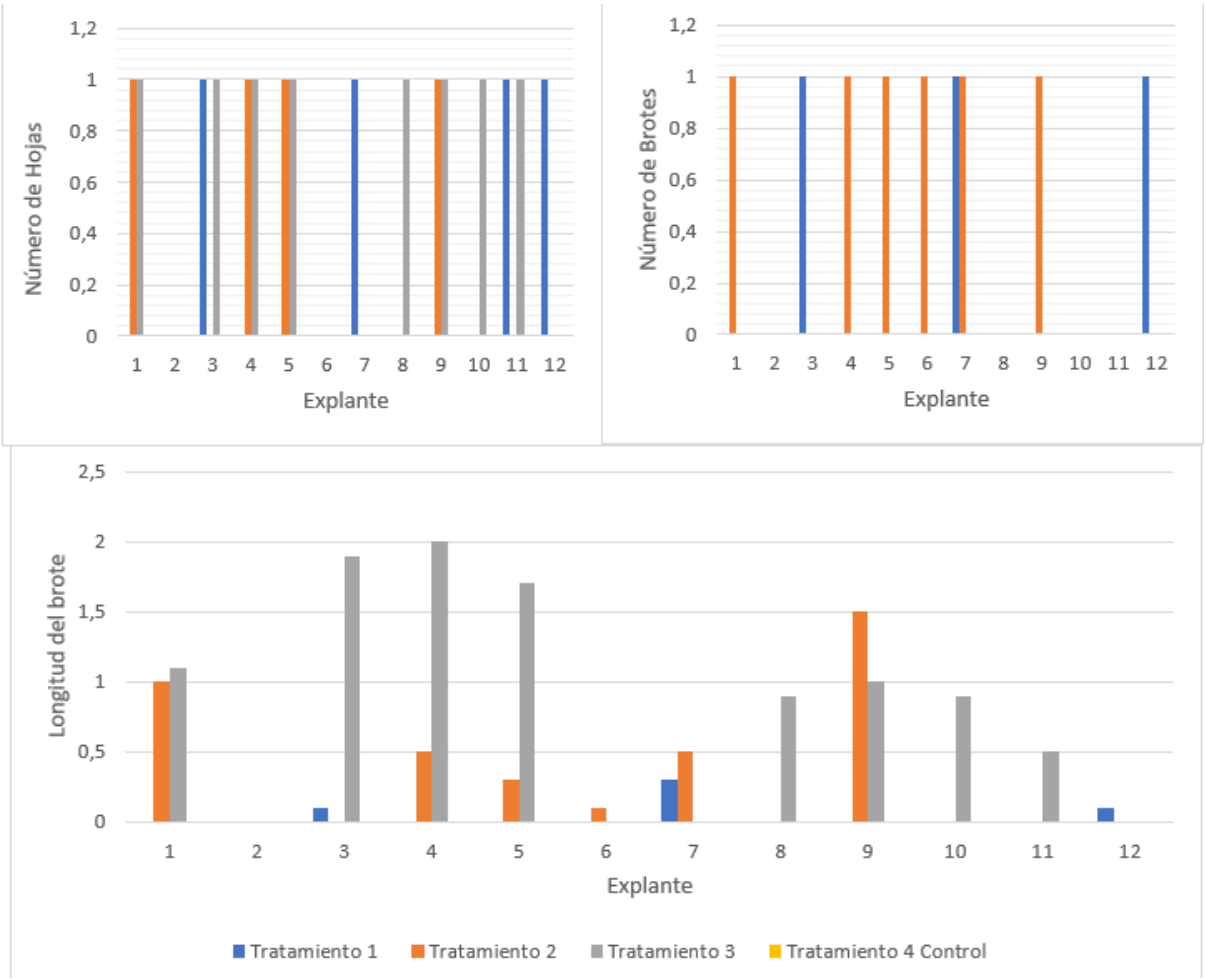
Evolución del desarrollo de organogénesis (número de hojas, número de brotes, longitud de explantes)



Nota. Este anexo representa el desarrollo de los explantes en relación al tiempo, representando el número de hojas, longitud y número de brotes máximo obtenido por tratamiento.

Anexo 9.

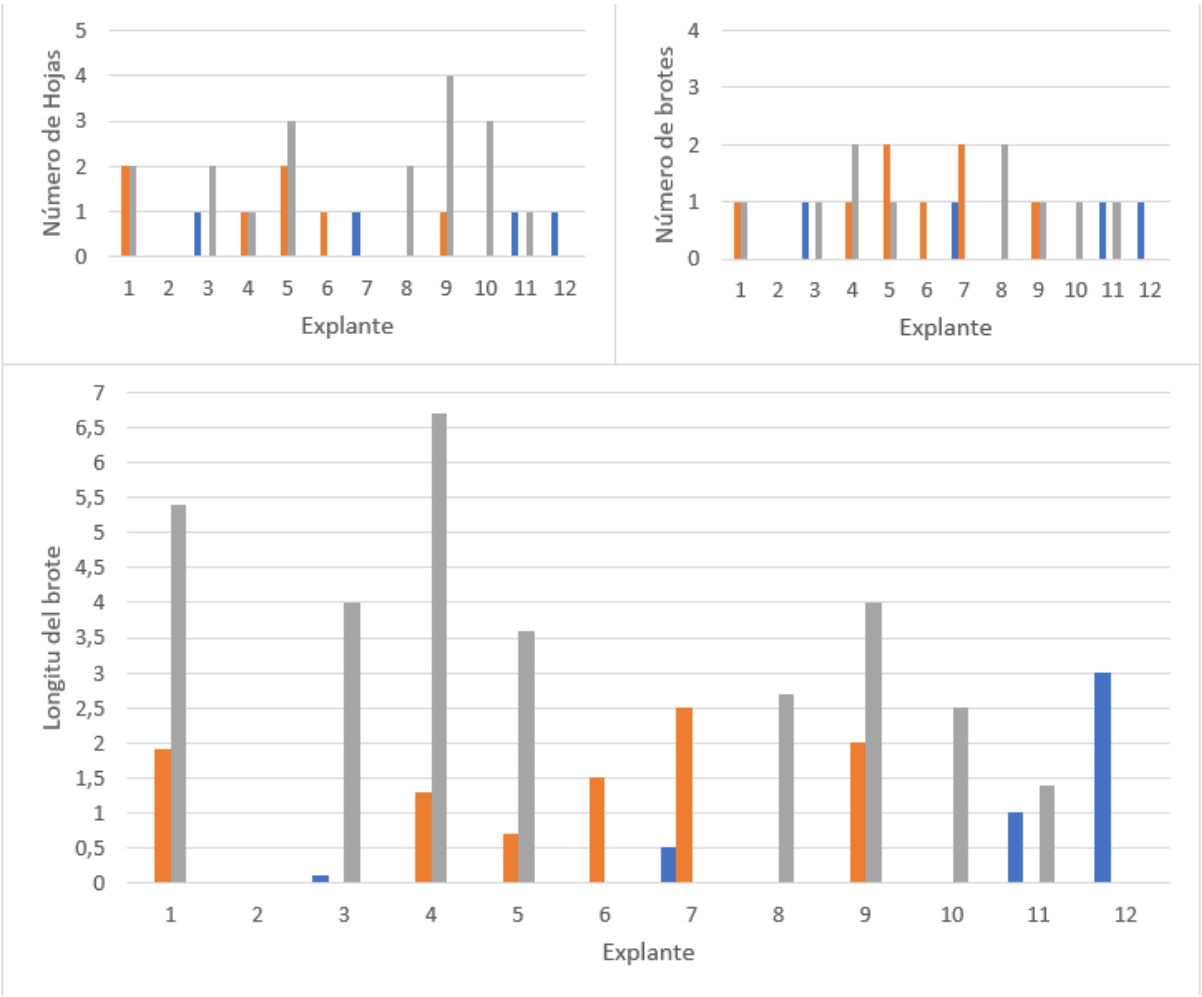
Evolución de la organogénesis en relación al tiempo y tratamientos aplicados (Semana 3)



Nota. Se representan los valores obtenidos de la tercera semana de incubación, según el número de explantes viables con sus máximos en crecimiento por tratamiento.

Anexo 10.

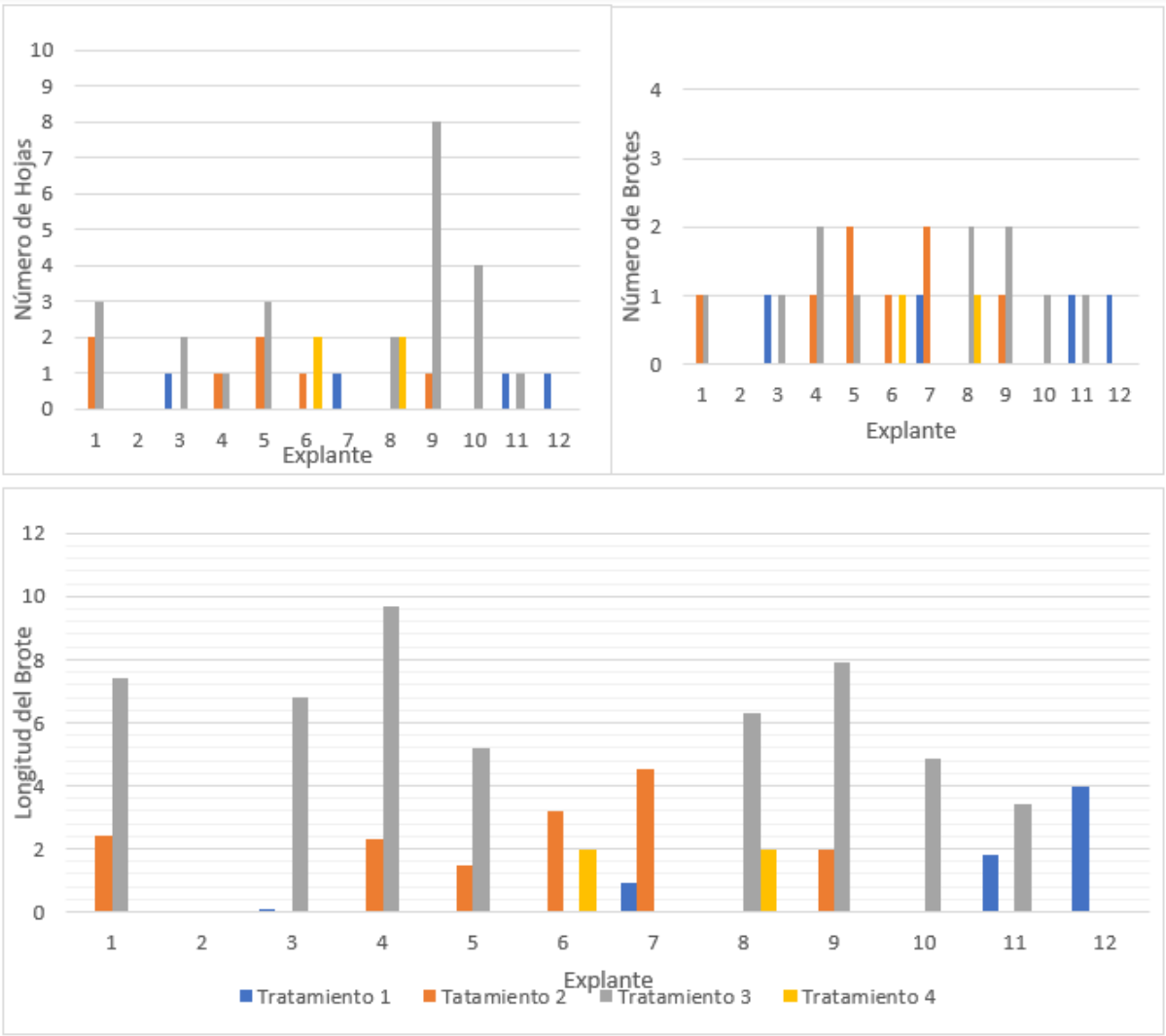
Evolución de la organogénesis en relación al tiempo y tratamientos aplicados (Semana 5)



Nota. Se representan los valores obtenidos de la quinta semana de incubación, según el número de explantes viables con sus máximos en crecimiento por tratamiento

Anexo 11.

Evolución de la organogénesis en relación al tiempo y tratamientos aplicados (Semana 7)



Nota. Se representan los valores obtenidos de la septima semana de incubación, según el número de explantes viables con sus máximos en crecimiento por tratamiento

Anexo 12.

Código utilizado en Colab para realizar el diseño experimental DCA.

```
# Importar librerías necesarias
import pandas as pd

# Datos
tratamientos = [
    'T1', 'T1', 'T1', 'T1', 'T1', 'T1', 'T1', 'T1', 'T1', 'T1', 'T1', 'T1',
    'T2', 'T2', 'T2', 'T2', 'T2', 'T2', 'T2', 'T2', 'T2', 'T2', 'T2', 'T2',
    'T3', 'T3', 'T3', 'T3', 'T3', 'T3', 'T3', 'T3', 'T3', 'T3', 'T3', 'T3',
    'T4', 'T4', 'T4', 'T4', 'T4', 'T4', 'T4', 'T4', 'T4', 'T4', 'T4', 'T4'
]

# Respuestas asociadas a cada tratamiento
respuestas = [
    0, 0, 0, 0, 0, 0, 0.9, 0, 0, 0, 1.8, 4,  # T1
    2.42, 0, 0, 2.3, 1.5, 3.2, 4.5, 0, 2, 0, 0, 0,  # T2
    7.4, 0, 6.8, 9.7, 5.2, 0, 0, 6.3, 7.9, 4.85, 3.4, 0,  # T3
    0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0   # T4
]

# Crear un DataFrame con los datos
diseño_df = pd.DataFrame({
    'Unidad Experimental': range(1, len(tratamientos) + 1),
    'Tratamiento': tratamientos,
    'Respuesta': respuestas
})

# Mostrar el diseño experimental con los datos
print("Diseño Experimental con Datos:")
print(diseño_df)

# Guardar los datos en un archivo CSV
diseño_df.to_csv("diseño_experimental_datos_reales.csv", index=False)
print("\nEl diseño experimental con datos se ha guardado como
'diseño_experimental_datos_reales.csv'.")
```

```
# Código del ANOVA
# Importar librerías necesarias
import pandas as pd
import statsmodels.api as sm
from statsmodels.formula.api import ols
import matplotlib.pyplot as plt
import seaborn as sns
from scipy.stats import shapiro, levene

# Leer el archivo CSV con los datos del diseño experimental
# Asegúrate de que el archivo esté en el mismo directorio o proporciona la ruta completa
datos_df = pd.read_csv("diseño_experimental_datos_reales.csv")

# Mostrar los primeros registros para verificar los datos
print("Datos cargados:")
print(datos_df.head())

# Gráfico preliminar: caja y bigotes para explorar los datos
sns.boxplot(x='Tratamiento', y='Respuesta', data=datos_df)
plt.title("Distribución de Respuestas por Tratamiento")
plt.show()

# Comprobación de supuestos
# 1. Normalidad (prueba de Shapiro-Wilk)
print("\nPrueba de normalidad por tratamiento (Shapiro-Wilk):")
for tratamiento in datos_df['Tratamiento'].unique():
    stat, p_value = shapiro(datos_df[datos_df['Tratamiento'] == tratamiento]['Respuesta'])
    print(f"{tratamiento}: W = {stat:.4f}, p = {p_value:.4f}")

# 2. Homogeneidad de varianzas (prueba de Levene)
stat, p_value = levene(
    *[datos_df[datos_df['Tratamiento'] == t]['Respuesta'] for t in datos_df['Tratamiento'].unique()]
)
print(f"\nPrueba de homogeneidad de varianzas (Levene): W = {stat:.4f}, p = {p_value:.4f}")

# Realizar el ANOVA
```

```
modelo = ols('Respuesta ~ C(Tratamiento)', data=datos_df).fit()
anova_table = sm.stats.anova_lm(modelo, typ=2)

# Mostrar resultados del ANOVA
print("\nResultados del ANOVA:")
print(anova_table)

# Interpretación de resultados
alpha = 0.05
if anova_table["PR(>F)"][0] < alpha:
    print("\nHay diferencias significativas entre los tratamientos (p < 0.05).")
else:
    print("\nNo hay diferencias significativas entre los tratamientos (p >= 0.05).")

# Gráfica de residuos para evaluar el modelo
residuos = modelo.resid
sns.histplot(residuos, kde=True)
plt.title("Distribución de los Residuos")
plt.show()

# Gráfico de residuos vs valores ajustados
valores_ajustados = modelo.fittedvalues
plt.scatter(valores_ajustados, residuos)
plt.axhline(0, color='red', linestyle='--')
plt.title("Residuos vs Valores Ajustados")
plt.xlabel("Valores Ajustados")
plt.ylabel("Residuos")
plt.show()

# Prueba de Tukey
from statsmodels.stats.multicomp import pairwise_tukeyhsd

# Realizar la prueba de Tukey
tukey = pairwise_tukeyhsd(endog=datos_df['Respuesta'],  # Variable dependiente
                          groups=datos_df['Tratamiento'],  # Grupos (tratamientos)
                          alpha=0.05)  # Nivel de significancia
```

```
# Mostrar resultados de la prueba de Tukey
print("\nResultados de la prueba de Tukey:")
print(tukey)

# Visualizar los resultados de Tukey
tukey.plot_simultaneous(comparison_name='T1')
plt.title("Prueba de Tukey: Comparaciones múltiples")
plt.show()
```

Nota. El código presentado se encuentra en conjunto con el código ANOVA y el código de la prueba de medias de Tukey, utilizado tanto en el número de hojas, brotes y la longitud de explantes.

Anexo 13.

Resultados del ANOVA

a)

```
Prueba de normalidad por tratamiento (Shapiro-Wilk):
T1: W = 0.5516, p = 0.0000
T2: W = 0.8222, p = 0.0169
T3: W = 0.8828, p = 0.0952
T4: W = 1.0000, p = 1.0000

Prueba de homogeneidad de varianzas (Levene): W = 12.5333, p = 0.0000

Resultados del ANOVA:
                   sum_sq    df          F    PR(>F)
C(Tratamiento)  131.703473   3.0  10.675801  0.000021
Residual        180.937325  44.0        NaN       NaN

Hay diferencias significativas entre los tratamientos (p < 0.05).
```

b)

```
Prueba de normalidad por tratamiento (Shapiro-Wilk):
T1: W = 0.6081, p = 0.0001
T2: W = 0.7292, p = 0.0016
T3: W = 0.8389, p = 0.0268
T4: W = 1.0000, p = 1.0000

Prueba de homogeneidad de varianzas (Levene): W = 7.5778, p = 0.0003

Resultados del ANOVA:
                   sum_sq    df         F    PR(>F)
C(Tratamiento)  33.229167   3.0  7.037706  0.000576
Residual        69.250000  44.0       NaN       NaN

Hay diferencias significativas entre los tratamientos (p < 0.05).
```

c)

```
Prueba de normalidad por tratamiento (Shapiro-Wilk):
T1: W = 0.6081, p = 0.0001
T2: W = 0.7772, p = 0.0052
T3: W = 0.8244, p = 0.0180
T4: W = 1.0000, p = 1.0000

Prueba de homogeneidad de varianzas (Levene): W = 6.5326, p = 0.0009

Resultados del ANOVA:
                   sum_sq    df        F    PR(>F)
C(Tratamiento)   5.729167   3.0  5.17094  0.003786
Residual        16.250000  44.0      NaN       NaN

Hay diferencias significativas entre los tratamientos (p < 0.05).
```

Nota. Los valores representados en la figura a) corresponden a la longitud del brote, mientras que b) y c) corresponden al número de hojas y brotes en ese orden

Anexo 14.

Resultados de la prueba Tukey

a)

Resultados de la prueba de Tukey:
Multiple Comparison of Means - Tukey HSD, FWER=0.05

group1	group2	meandiff	p-adj	lower	upper	reject
T1	T2	0.7683	0.79	-1.4421	2.9788	False
T1	T3	3.7375	0.0003	1.5271	5.9479	True
T1	T4	-0.5583	0.9062	-2.7688	1.6521	False
T2	T3	2.9692	0.0045	0.7587	5.1796	True
T2	T4	-1.3267	0.3878	-3.5371	0.8838	False
T3	T4	-4.2958	0.0	-6.5063	-2.0854	True

b)

Resultados de la prueba de Tukey:
Multiple Comparison of Means - Tukey HSD, FWER=0.05

group1	group2	meandiff	p-adj	lower	upper	reject
T1	T2	0.25	0.9613	-1.1175	1.6175	False
T1	T3	1.8333	0.0046	0.4659	3.2008	True
T1	T4	-0.3333	0.9147	-1.7008	1.0341	False
T2	T3	1.5833	0.0175	0.2159	2.9508	True
T2	T4	-0.5833	0.6677	-1.9508	0.7841	False
T3	T4	-2.1667	0.0007	-3.5341	-0.7992	True

c)

Resultados de la prueba de Tukey:
Multiple Comparison of Means - Tukey HSD, FWER=0.05

group1	group2	meandiff	p-adj	lower	upper	reject
T1	T2	0.3333	0.5408	-0.3291	0.9958	False
T1	T3	0.5833	0.102	-0.0791	1.2458	False
T1	T4	-0.3333	0.5408	-0.9958	0.3291	False
T2	T3	0.25	0.7458	-0.4124	0.9124	False
T2	T4	-0.6667	0.048	-1.3291	-0.0042	True
T3	T4	-0.9167	0.0033	-1.5791	-0.2542	True

Nota. Los valores representados en la figura a) corresponden a la longitud del brote, mientras que b) y c) corresponden al número de hojas y brotes en ese orden