



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO



FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Tema: Evaluación de la incidencia de Woody Plant Medium y ácido indol-3-butírico sobre el enraizamiento *in vitro* de explantes de *Myrcianthes rhopaloides*. Articulado al Proyecto de Prácticas de Servicio Comunitario aprobado mediante Resolución Nro. UTA-CONVISO-2024-009.

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autora: Evelyn Monserrath Rivadeneira Salazar

Tutora: 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 Ciencias e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 17 de enero de 2025



Dra. Helena Maritza De la Torre Olvera

1309651998

TUTORA

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Evelyn Monserrath Rivadeneira Salazar, 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 Ingeniera Biotecnóloga son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Evelyn Monserrath Rivadeneira Salazar

1805201157

AUTORA

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 los 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 mis derechos de autor.



Evelyn Monserrath Rivadeneira Salazar

1805201157

AUTORA

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:



Firmado electrónicamente por:
**LORENA DE LOS
ANGELES NUNEZ
VILLACIS**

Presidente del Tribunal



Firmado electrónicamente por:
**CRISTIAN FERNANDO
GALARZA GALARZA**

Mg. Cristian Fernando Galarza Galarza

1803316027-2



Firmado electrónicamente por:
**ORESTES DARIO LOPEZ
HERNANDEZ**

Dr. Orestes Darío López Hernández

175478486-4

Ambato, 04 de febrero de 2025

DEDICATORIA

“Aún juntas un poquito diferentes”

-Tala, Moana 2 (2024)-

Para Zoila Victoria Martínez Say (Mamita mamina)

*Todo esto es por y para usted, espero que lo vea en cualquier rinconcito del cielo en
que se encuentre.*

A Dios por haberme guiado en este camino, por haberme dado la fuerza para seguir a pesar de las adversidades, por enseñarme a no rendirme fácilmente.

A mi familia, mi padre Roberto y mi madre Priscila por estar siempre conmigo, por apoyarme y empujarme a cumplir todos mis sueños. Su amor incondicional y su apoyo han sido mis pilares para mi éxito. Siempre han permanecido a mi lado a pesar de los tropiezos, por todo esto les viviré eternamente agradecida.

A mis mamita Hilda, por sus consejo y bendiciones, por sus oraciones.

A mis ñañas, Erika, Sandra, Elena, Mónica y Alicia por confiar en mí, por su cariño y apoyo incondicional.

Monserrath Rivadeneira

AGRADECIMIENTO

Con profundo respeto y gratitud, en primer lugar, agradezco a Dios por haberme cuidado y otorgado la fortaleza necesaria para enfrentar cada adversidad con determinación y esperanza.

A mi padre, Roberto, gracias por inculcarme tu pasión y respeto por las plantas, y por enseñarme a perseverar hasta el final para dar siempre lo mejor de mí. A mi madre, Priscila, cuyo ejemplo de lucha y dedicación ha sido mi mayor inspiración, mostrándome cómo vivir con amor, esfuerzo y gratitud por cada instante.

A mi hermana Galilea, por ser ese rayo de luz en los momentos difíciles, mi fuente de motivación e inspiración para superar cualquier obstáculo. A Danna, mi niña, gracias por los años de peleas, risas, consejos y aventuras que hemos compartido. Eres más que una amiga, mi primera hermana, y siempre ocuparás un lugar especial en mi corazón.

A Jorge, Victor, Shini y Mimi, quienes han sido más que compañeros de estudio, convirtiéndose en amigos entrañables. Gracias por su tiempo, paciencia y por los momentos inolvidables que compartimos a lo largo de esta carrera. Su amistad ha sido una fuente inagotable de alegría y aprendizaje que atesoraré siempre.

A mis compis de laboratorio Alejo y Marce, por llenar esos días de risas y diversión.

A Andrés, por creer en mí incluso cuando yo misma no lo hacía. Tu confianza fue fundamental para que pudiera superar mis propios límites.

Mi más sincero agradecimiento a mi tutora, la Dra. Helena De la Torre, por su guía excepcional, sus valiosas enseñanzas y su apoyo inquebrantable a lo largo de este proceso.

*Al Sr. Patricio Mayorga, le agradezco profundamente por abrirme las puertas de su hogar y facilitarme el acceso a sus plantas de *M. rhopaloides*, un recurso esencial para llevar a cabo esta investigación.*

Finalmente, extendiendo mi gratitud a la Universidad Técnica de Ambato y a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, por brindarme una formación integral durante todos estos años, contribuyendo de manera significativa a mi crecimiento personal y profesional.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

PORTADA.....	i
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 DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN EJECUTIVO	xii
ABSTRACT.....	xiii
CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 Justificación.....	1
1.1.1 Generalidades de <i>M. rhopaloides</i>	2
1.1.2 Enraizamiento <i>in vitro</i>	5
1.1.3 Medios de cultivo	11
1.1.4 Fitohormonas.....	13
1.1.5 Tecnología para el análisis de crecimiento radicular.	15
1.2 Objetivos	17
1.2.1 Objetivo general	17
1.2.2 Objetivos específicos	17
1.3 Hipótesis.....	18
1.3.1 Hipótesis nula	18
1.3.2 Hipótesis alternativa	18
CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA.....	19
2.1 Materiales.....	19
2.1.1 Recursos institucionales.....	19
2.1.2 Recursos materiales	19
2.2 Métodos.....	20
CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
3.1 Determinar el porcentaje de enraizamiento <i>in vitro</i> de explantes de <i>M. rhopaloides</i> a partir del medio Woody Plant Medium.	33
3.1.1 Recolección de datos.	33

3.1.2	Eficiencia del medio Woody Plant Medium.	34
3.1.3	Aislamiento e identificación de hongos (muestras contaminadas).	36
3.2	Analizar el impacto del ácido indol-3-butírico en el proceso de enraizamiento <i>in vitro</i> de los explantes de <i>M. rhopaloides</i>	37
3.3	Identificar el tipo de explantes que promuevan la mayor masa radicular <i>in vitro</i> de <i>M. rhopaloides</i>	42
CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		47
4.1	Conclusiones	47
4.2	Recomendaciones.....	48
MATERIALES DE REFERENCIA.....		49
ANEXOS		54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 <i>Taxonomía M. rhopaloides</i>	3
Tabla 2 <i>Recursos materiales del proyecto</i>	19
Tabla 3 <i>Resultados viabilidad, oxidación y contaminación de los explantes de M. rhopaloides</i>	33
Tabla 4 <i>Porcentajes de contaminación, viabilidad y oxidación de explantes de M. rhopaloides en WPM+AIB</i>	38
Tabla 5 <i>Resultados longitud de raíces</i>	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>M. Rhopaloides</i> hojas y flores.....	2
Figura 2. <i>Recolección de brotes de M. rhopaloides</i>	21
Figura 3. <i>Desinfección de brotes de M. rhopaloides</i>	23
Figura 4. <i>Dosificación de medios de cultivo.</i>	25
Figura 5. <i>Siembra de explantes de M. rhopaloides</i>	26
Figura 6. <i>Diseño experimental del proyecto</i>	27
Figura 7. <i>Dosificación WPM + AIB en tubos de ensayo.</i>	29
Figura 8. <i>Medición de raíces</i>	31
Figura 9. <i>Brotes internodales en medio WPM en crecimiento Semana 3.</i>	35
Figura 10. <i>Brote in vitro contaminado 2WA de M. rhopaloides</i>	36
Figura 11. <i>Aislamiento hongo muestra 2WA en PDA.</i>	37
Figura 12. <i>Comparación de longitudes por tipo de explante.</i>	40
Figura 13. <i>Comparación longitudes por concentración de AIB</i>	41
Figura 14. <i>Explante internodal semana 3, primeros brotes.</i>	43
Figura 15. <i>Explante internodal de 5 semanas de crecimiento en SmartRoot</i>	44
Figura 16. <i>Evolución temporal por concentración y tipo de explantes.</i>	45

RESUMEN EJECUTIVO

Este trabajo se centró en el enraizamiento *in vitro* de explantes de *Myrcianthes rhopaloides*, una especie vegetal amenazada con alto valor ecológico y farmacológico. La investigación busca contribuir al conocimiento científico sobre la propagación de plantas nativas con potencial terapéutico y apoyar la conservación de esta especie mediante técnicas de micropropagación. La metodología incluyó la selección y desinfección de explantes provenientes de ramas jóvenes saludables de *M. rhopaloides*, los cuales fueron cultivados en medios enriquecidos con diferentes concentraciones de AIB. Se realizaron mediciones periódicas para evaluar la viabilidad de los explantes, el porcentaje de oxidación, contaminación y la longitud de las raíces formadas. Además, se utilizaron herramientas digitales como el software SmartRoot para analizar el desarrollo radicular. El diseño experimental se estructuró mediante pruebas factoriales con varias réplicas para garantizar la confiabilidad de los resultados. Los resultados evidenciaron que los explantes internodales presentaron un mejor desarrollo radicular en comparación con los apicales. Asimismo, se observó que la concentración de 0.2 mg por litro de AIB promueve el crecimiento radicular de manera efectiva, aunque también incrementa la oxidación de los explantes. Las tasas de viabilidad alcanzaron el 62.5 por ciento en explantes tratados con WPM, mientras que el porcentaje de contaminación y oxidación se mantuvo por debajo del 20 por ciento. Estos hallazgos destacan la importancia de ajustar las condiciones de cultivo y concentraciones hormonales para maximizar el éxito del cultivo *in vitro*.

Palabras claves: Enraizamiento *in vitro*, Woody Plant Medium, ácido indol-3-butírico, explantes internodales, explantes apicales, SmartRoot.

ABSTRACT

This work focused on the *in vitro* rooting of explants of *Myrcianthes rhopaloides*, an endangered plant with high ecological and pharmacological value. The research aims to contribute to scientific knowledge on the propagation of native plants with therapeutic potential and to support the conservation of this species through micropropagation techniques. The methodology included the selection and disinfection of explants from healthy young branches of *M. rhopaloides*, which were grown in enriched media with different concentrations of AIB. Periodic measurements were performed to assess the viability of explants, the percentage of oxidation, contamination and the length of roots formed. In addition, digital tools such as SmartRoot software were used to analyze root development. The experimental design was structured using factorial tests with several replicates to ensure the reliability of the results. The results showed that internodal explants showed better root development compared to apical explants. A concentration of 0.2 mg per liter of AIB was found to promote root growth effectively, although it also increased the oxidation of the explants. Viability rates reached 62.5 percent in WPM treated explants, while the percentage of contamination and oxidation remained below 20 percent. These findings highlight the importance of adjusting culture conditions and hormone concentrations to maximize *in vitro* culture success.

Key words: In vitro rooting, Woody Plant Medium, indole-3-butyric acid, internodal explants, apical explants.

CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO

1.1 Justificación

Uno de los efectos adversos de la agricultura es la tala indiscriminada de los bosques andinos, esta situación ha llevado al arrayan negro (*Myrcianthes rhopaloides*) a ser catalogada como especie vegetal en peligro de extinción (Cueva et al., 2019). En 2017, el Centro de Investigación para el Territorio y Hábitat Sostenible (CITEHS) de la Universidad Indoamérica llevó a cabo un estudio de la cordillera noroccidental del Distrito Metropolitano de Quito, en el que se encontró un solo ejemplar de *M. Rhopaloides* de manera silvestre (Uvidia et al., 2022).

Los aceites obtenidos del arrayan negro poseen propiedades antibióticas y antimicrobianas (Silva, 2016); dentro de los compuestos encontrados en sus aceites destacan el linalol, eucaliptol, D-limoneno y terpinol. Según un estudio se evidencia una capacidad antimicrobiana alta en contra de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus pyogenes* (Torres, 2017). Para esta especie existen varias investigaciones al nivel bioquímico, dichas investigaciones han ido disminuyendo con el pasar del tiempo por la poca existencia de *M. Rhopaloides* (Guerrero y Pozo, 2016).

Con base en la información presentada anteriormente, la investigación plantea la evaluación de la interacción del medio de cultivo Woody Plant Medium con la adición de distintas concentraciones de ácido indol-3-butírico usando explantes para promover un desarrollo más eficiente de *M. Rhopaloides* (Jha y Halder, 2023). Este enfoque creara un mayor interés en la micropropagación *in vitro* de plantas con potencial en la industria biofarmacéutica.

1.1.1 Generalidades de *M. Rhopaloides*

1.1.1.1 Morfología de *M. Rhopaloides*

El arrayan negro pertenece a la familia *Myrtaceae*, posee características leñosas, una alta longevidad con una altura máxima de 20 metros y un tronco de 50 a 80 cm de ancho, su corteza está formada de placas desprendibles de color pálido, el follaje que posee es denso y oscuro; por otro lado, sus frutos poseen una pigmentación variable de un color vino tinto a un morado oscuro con una forma ovalada y son comestibles (**Proença y Lucas, 2023**).

Las flores de *M. Rhopaloides* presentan pétalos de coloración blanca; sus semillas no presentan endospermo lo que provee una cualidad destacable. Su fruto es comestible, de una tonalidad negra casi violeta, en esta etapa el fruto es apto para consumo animal y humano, presenta un sabor dulce y agradable. Normalmente *M. Rhopaloides* fructifica en los meses de enero a marzo (**Silva et al., 2016**).

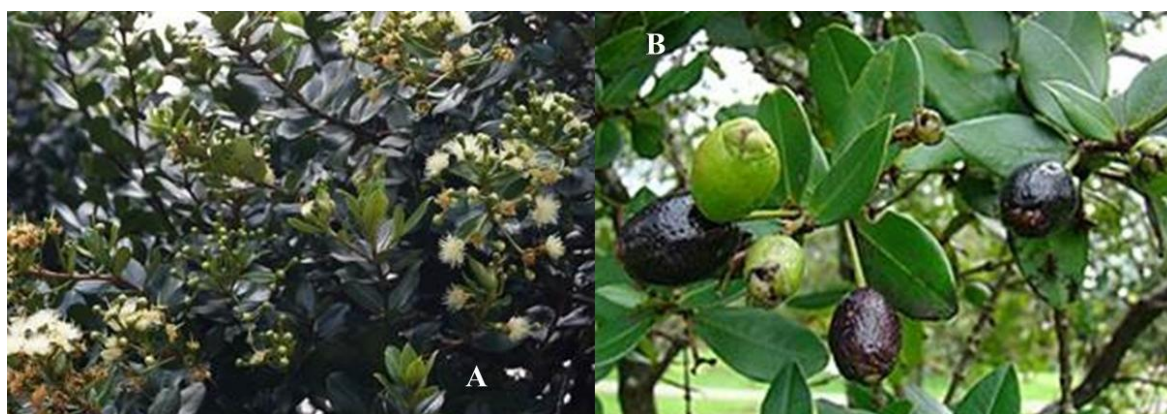


Figura 1. *M. Rhopaloides* hojas y flores

Nota. A) Flores de *M. rhopaloides*; B) Frutos de *M. Rhopaloides* Tomado de Phytoimages, por Morrow, J. (2016).

1.1.1.2 Taxonomía

Sistema de clasificación que organiza la diversidad de la vida en una estructura jerárquica. En el estudio de la botánica, la taxonomía es el eje central para la identificación y el estudio de plantas, en la **Tabla 1** se presenta la clasificación taxonómica de *M. Rhopaloides*, especie perteneciente al reino Plantae, clasificado de acuerdo con la nomenclatura binomial y las categorías taxonómicas estándar (Rodríguez, 2006).

Tabla 1

Taxonomía M. Rhopaloides

Reino	Plantae
División	Fanerogamae
Subdivisión	Angiospermae
Clase	Dicotyledonae
Orden	Mytales
Familia	<i>Myrtaceae</i>
Género	Myrcianthes
Especie	<i>M. Rhopaloides</i>

Nota: Da Silva et al. (2014)

1.1.1.3 Ubicación geográfica de *M. rhopaloides*

Generalmente crece tanto en áreas secas, húmedas y montañosas a zonas nubladas debido a su tolerancia a la falta de luz. El arrayan negro se encuentra en provincias como Azuay, Bolívar y Loja, indicando una prevalencia en la región andina del sur de Ecuador **(Vistín y Espinoza, 2021)**.

1.1.1.4 Importancia de *M. rhopaloides* en el Ecuador

Siendo una especie leñosa su uso principal se concentra en ser un recurso para la industria maderera, esto debido a que posee una de las maderas más compactas y durables; en su mayoría se emplea para realizar el mango de herramientas y muebles extremadamente resistentes; debido a las características anteriores es sobreexplotado; junto con la expansión agrícola y otras actividades humanas han disminuido la población de arrayan **(Sharry et al., 2020)**.

Otros usos que se le da por parte de comunidades indígenas son para tratar caries y diversas dolencias relacionadas a la zona bucal y otras heridas en preparaciones de bálsamos, esto debido a sus propiedades terapéuticas astringentes y estimulantes **(Jha y Halder, 2023)**.

1.1.2 Enraizamiento *in vitro*

1.1.2.1 Definición y beneficios

Técnica que permite el desarrollo de plantas en un ambiente controlado si la necesidad de la presencia de suelo, con el uso de medios de cultivo en conjunto con nutrientes y suplementos específicos, lo que brinda la capacidad de producción de plantas genéticamente idénticas desde una sola planta madre a una gran escala **(Franco et al., 2024)**.

1.1.2.2 Tipos de enraizamiento *in vitro*

1.1.2.2.1 Enraizamiento directo

1.1.2.2.1.1 Enraizamiento mediante explantes

1.1.2.2.1.1.1 Definición del enraizamiento mediante explantes

El enraizamiento por explantes es una técnica fundamental en la biotecnología vegetal que consiste en el uso de fragmentos de tejido vegetal (explantes) para su crecimiento y desarrollo en condiciones controladas y estériles. Estos tejidos, que pueden provenir de diferentes partes de la planta, se cultivan en medios nutritivos especialmente diseñados para estimular su división y diferenciación celular. Este método permite reproducir y manipular material vegetal con fines experimentales, productivos o de conservación, manteniendo un entorno libre de contaminantes y con los nutrientes necesarios. **(Bustamante et al., 2022)**.

1.1.2.2.1.1.2 Usos del enraizamiento mediante explantes

El enraizamiento por explantes tiene aplicaciones variadas y significativas. Es una herramienta crucial en el mejoramiento genético de plantas, permitiendo la introducción de genes de interés a través de técnicas de transformación genética. Asimismo, se utiliza para la producción de metabolitos secundarios, compuestos químicos valiosos en las industrias farmacéutica, alimentaria y cosmética **(Silva et al., 2016)**. Además, esta técnica es indispensable en la agricultura moderna para la micropropagación de cultivos de alto valor, como frutas, hortalizas, flores ornamentales y plantas forestales **(Eras et al., 2019)**. Por último, en el ámbito de la investigación, los cultivos por explantes se usan como sistemas modelo para estudiar procesos fisiológicos, celulares y moleculares **(Castillo, 2008)**.

1.1.2.2.1.1.3 Beneficios del enraizamiento mediante explantes

El enraizamiento por explantes presenta múltiples ventajas en la investigación y la industria agrícola. En primer lugar, permite la propagación masiva de plantas genéticamente idénticas, conocida como clonación, lo que asegura la uniformidad de cultivos y maximiza el aprovechamiento de características deseables, como mayor productividad o resistencia a plagas **(Eras et al., 2019)**. Además, esta técnica es esencial para la conservación de especies en peligro de extinción o con valor económico, ya que los explantes pueden ser almacenados o regenerados en cualquier momento **(Rodríguez, 2006)**. También se emplea en la eliminación de patógenos, como virus, a través de la regeneración de plantas sanas a partir de tejidos libres de infecciones **(Polo et al., 2013)**.

1.1.2.2.1.1.4 Tipos de explantes usados

En el enraizamiento *in vitro*, los tipos de explantes utilizados varían dependiendo de la especie vegetal y el objetivo específico del cultivo. Generalmente, se eligen tejidos que tengan una alta capacidad de diferenciación y que respondan favorablemente a los reguladores del crecimiento aplicados en el medio de cultivo **(Rojas et al., 2021)**.

1.1.2.2.1.1.4.1 Explantes internodales

Obtenidos de los segmentos nodales de la planta que contienen yemas axilares las cuales son capaces de desarrollar raíces adventicias rápida y eficientemente, debido a que poseen alta presencia de células madre potenciales para diferenciación y regeneración de tejidos **(Castillo et al., 2019)**.

1.1.2.2.1.1.4.2 Explantes apicales

Provenientes de las yemas precursoras del tallo, promueven el desarrollo de ejemplares con una genética estable y de poco riesgo de contaminación por patógenos, bacterias u hongos de la planta madre después del protocolo de desinfección, son fácilmente almacenables por largos periodos de tiempo manteniendo su inocuidad **(Salazar, 2020)**.

1.1.2.2.2 Enraizamiento indirecto

1.1.2.2.2.1 Callogénesis

1.1.2.2.2.1.1 Definición

La callogénesis es un proceso biológico caracterizado por la formación de callos, que son masas de células indiferenciadas que se generan a partir de tejidos vegetales cultivados en condiciones *in vitro*. Este proceso se desencadena por la interacción de diversos factores, como el tipo de explante, la composición del medio de cultivo y la presencia de reguladores del crecimiento vegetal, especialmente auxinas y citoquininas. La capacidad de generar callos es una característica clave en la biotecnología vegetal, ya que constituye un punto de partida para diversas aplicaciones (Mata et al., 2023).

1.1.2.2.2.1.2 Usos de la callogénesis

La callogénesis tiene una amplia gama de aplicaciones prácticas en la biotecnología vegetal. Se utiliza en la producción de metabolitos secundarios, como alcaloides, flavonoides o fenoles, que tienen valor comercial en las industrias farmacéutica y cosmética. También es esencial en la obtención de plantas transgénicas mediante la introducción de genes de interés en las células de los callos, seguido de su regeneración en plantas completas. Asimismo, este proceso es fundamental en estudios de toxicología y estrés ambiental (Mata et al., 2023).

1.1.2.2.1.3 Beneficios de la callogénesis

La callogénesis ofrece múltiples beneficios en el ámbito de la investigación y la biotecnología. En primer lugar, permite la propagación clonal de plantas, lo que es esencial para la producción masiva de cultivos con características deseables, como resistencia a enfermedades o mejor rendimiento. Además, facilita la conservación de germoplasma, ya que los callos pueden almacenarse a largo plazo bajo condiciones criogénicas. Otro beneficio relevante es su uso en programas de mejoramiento genético, donde los callos sirven como material base para la transformación genética o para la regeneración de plantas a través de técnicas de embriogénesis somática (**Sánchez y Alvarenga, 2014**).

1.1.2.3 Tipos de contaminación en el cultivo *in vitro*.

En el cultivo *in vitro* de explantes, la contaminación constituye un problema crítico que puede comprometer el éxito del proceso. Existen diversos tipos de contaminación que deben ser controlados. La contaminación biológica es provocada por microorganismos como bacterias, hongos y levaduras. Las bacterias, que suelen provenir del material vegetal, el ambiente o el equipo no esterilizado, se caracterizan por su rápido crecimiento y formación de colonias visibles. Los hongos aparecen comúnmente como micelios en la superficie del medio de cultivo, provenientes del explante o del aire, mientras que las levaduras, aunque menos comunes, tienden a desarrollarse en medios ricos en azúcares (**Marsola et al., 2022**). La contaminación química, por su parte, ocurre debido a la presencia de sustancias no deseadas en los medios de cultivo, reactivos o contenedores, tales como residuos de detergentes, restos de pesticidas o herbicidas del material vegetal, e impurezas en el agua utilizada para la preparación del medio. Asimismo, la contaminación endógena se origina dentro del propio explante, dado que algunos microorganismos endófitos pueden proliferar en el medio debido a

las condiciones favorables del cultivo, siendo difícil eliminarlos incluso con procedimientos de desinfección rigurosos **(Pérez-Moreno et al., 2020)**.

Por otro lado, la contaminación física incluye la presencia de partículas externas como polvo, fibras o restos orgánicos, que ingresan durante el manejo de los explantes o la preparación del medio. Esto puede deberse a técnicas de manipulación inadecuadas o a un ambiente no controlado. Finalmente, la contaminación cruzada ocurre cuando diferentes cultivos comparten patógenos debido al uso de equipos contaminados, como herramientas de corte o pinzas, especialmente si no se esterilizan correctamente entre usos. Para prevenir la contaminación, es fundamental implementar medidas como el uso de cabinas de flujo laminar, la esterilización adecuada del medio de cultivo y las herramientas mediante autoclave, la desinfección rigurosa del explante con agua, detergente, etanol o hipoclorito de sodio, y el control estricto del ambiente de trabajo para minimizar la presencia de contaminantes en el aire **(López et al., 2024)**.

1.1.2.4 Propósito del enraizamiento *in vitro*

La tecnología de enraizamiento *in vitro* ofrece ventajas sobre las especies vegetativas que serán cultivadas, las cuáles pueden ser; supervisión del desarrollo celular y mantenimiento de condiciones estériles para la producción y mejora del crecimiento de las raíces, así reduciendo el costo de mano de obra. Su importancia radica en su capacidad para apoyar la reforestación, la conservación de especies en peligro de extinción y la mejora de variedades para satisfacer las demandas del mercado. Es crucial seguir investigando y desarrollando técnicas de enraizamiento *in vitro* para impulsar la sostenibilidad y la productividad en la industria **(Tejada et al., 2019)**.

1.1.3 Medios de cultivo

Solución de varios nutrientes preparada para el crecimiento y mantenimiento de microorganismos, células o tejidos en un entorno controlado. Proporciona los elementos esenciales como carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales necesarios para la proliferación celular. Los medios de cultivo pueden ser líquidos (caldos) o sólidos (agar) y se utilizan en microbiología, biotecnología, y medicina. Sirven para aislar y estudiar microorganismos, producir antibióticos, vacunas, y enzimas, así como para la investigación de células madre y el desarrollo de cultivos celulares. Son cruciales para la identificación de patógenos, pruebas de susceptibilidad antimicrobiana y estudios genéticos **(Pinedo et al., 2022)**.

1.1.3.1 Woody plant medium (WPM)

Creado específicamente para cualquier tipo de especie leñosa esto debido a que induce al desarrollo de una estructura más densa y sólida y una corteza resistente siendo en extremo adecuado para la suplementación de *M. rhopaloides* **(Jayusman et al., 2022)**. Este fue desarrollado por Lloyd y Mcdown en 1981 para el cultivo de laurel de montaña posteriormente fue catalogado como óptimo para propagación y cultivo *in vitro* de cualquier especie leñosa **(Machado et al., 2020)**.

Woody Plant Medium (WPM) incluye micro y macroelementos esenciales para el crecimiento vegetal. Entre los microelementos, se destacan el sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) con 0.25 mg/l, hierro quelado (FeNaEDTA) a 36.70 mg/l, ácido bórico (H_3BO_3) a 6.20 mg/l, y otros

como sulfato de manganeso, molibdato de sodio y sulfato de zinc. Los macroelementos incluyen cloruro de calcio (CaCl_2) con 72.50 mg/l, nitrato de calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) a 471.26 mg/l, fosfato monopotásico (KH_2PO_4) a 170.00 mg/l, sulfato de potasio (K_2SO_4) con 990.00 mg/l, sulfato de magnesio (MgSO_4) a 180.54 mg/l y nitrato de amonio (NH_4NO_3) a 400.00 mg/l. Estos componentes son los que aportan los nutrientes necesarios para el crecimiento del material vegetal (**Plantigen Himedia, 2017**).

1.1.3.2 Murashige – Skoog

Este medio conocido como Murashige-Skoog es una mezcla que posee requerimientos nutricionales necesarios para casi todas las especies vegetales siendo así empleado como base para la mayoría de las fórmulas comerciales para cultivo, callogenesis y entre otras finalidades (**Andrade et al., 2021**).

El medio Murashige y Skoog (MS) contiene macronutrientes esenciales como nitrato de amonio (NH_4NO_3) a 1,650 mg/l, cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 440 mg/l, sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) a 370 mg/l, fosfato de potasio (KH_2PO_4) a 170 mg/l y nitrato de potasio (KNO_3) a 1,900 mg/l. Entre los micronutrientes se incluyen ácido bórico (H_3BO_3), cloruro de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), sulfato cúprico ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), yoduro de potasio (KI), molibdato de sodio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), además de $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ como quelante. También contiene vitaminas como i-Inositol, niacina, piridoxina (HCl), tiamina (HCl) y glicina, con edamina opcional (**Duchefa Biochemie, 2024**).

1.1.3.3 Papa Dextrosa Agar (PDA)

El medio de cultivo PDA (Potato Dextrose Agar) es un medio no selectivo, debido a su composición rica en carbohidratos y a su pH ligeramente ácido. Se emplea principalmente para el cultivo de hongos y levaduras, favoreciendo su crecimiento y facilitando la identificación de hongos fitopatógenos, levaduras industriales y otros microorganismos de interés. También se utiliza en pruebas de sensibilidad a antifúngicos, evaluando la eficacia de estos agentes en diferentes especies, y en la conservación de hongos, permitiendo su almacenamiento a corto plazo bajo condiciones específicas de laboratorio (**Liofilchem, 2016**).

Los componentes principales del medio PDA son el extracto de papa, que proporciona nutrientes esenciales como vitaminas y minerales; la dextrosa, que actúa como fuente de carbono y energía para favorecer el crecimiento microbiano; y el agar, que sirve como agente gelificante, proporcionando una superficie sólida adecuada para la proliferación de microorganismos (**Liofilchem, 2016**).

1.1.4 Fitohormonas

Uno de los mecanismos de regulación es el uso de señales químicas, esta comunicación se establece a través de hormonas vegetales o más conocidas como fitohormonas. Las fitohormonas son sustancias orgánicas completamente diferentes a nutrientes, estas sustancias son producidas por algunos tejidos (**Gopu et al., 2020**). En este proyecto se llevará a cabo el estudio de una auxina; permitirá la formación de raíces *in vitro* estableciendo así un potencial rizogénico de *M. rhopaloides*.

1.1.4.1 Auxinas

Las auxinas, desempeñan un papel crucial en el enraizamiento de explantes vegetales al promover la formación de raíces adventicias. Estas fitohormonas actúan regulando la división celular y la diferenciación en los tejidos del explante, facilitando la inducción de los primordios radiculares **(Valle, 2021)**. En la propagación *in vitro*, las auxinas se agregan al medio de cultivo para estimular la acumulación de células meristemáticas en la base del explante, lo que resulta en una mayor tasa de enraizamiento y un desarrollo radicular más rápido y uniforme.

1.1.4.2 Acido indol-3-butírico

El ácido indol-3-butírico, aunque se encuentra en menor proporción de manera natural, ha demostrado un notable potencial para promover el enraizamiento en plantas leñosas. Su uso es común en la propagación *in vitro* de esquejes y acodos. Este tipo de fitohormonas destaca por su capacidad para estimular la formación de raíces laterales, lo que facilita el desarrollo y la propagación de las plantas **(Sifuentes, 2021)**.

1.1.5 Tecnología para el análisis de crecimiento radicular.

1.1.5.1 Herramientas de análisis

Los modelos computacionales juegan un papel fundamental en el análisis del crecimiento radicular, ya que permiten simular y predecir cómo las raíces interactúan con el suelo y cómo responden a diferentes condiciones ambientales. Asimismo, se han desarrollado simulaciones en 3D que permiten estudiar el crecimiento radicular en respuesta a factores mecánicos y de estrés, facilitando una mejor comprensión de los procesos de absorción de agua y nutrientes en suelos compactos. Estas herramientas son especialmente útiles para diseñar estrategias de manejo agrícola que aumenten la productividad en diversas condiciones ambientales.

1.1.5.1.1 SmartRoot

SmartRoot es un software diseñado para analizar el crecimiento y la arquitectura (morfología) de las raíces de plantas a partir de imágenes digitales. Es un complemento de ImageJ, un software de código abierto integrado en la plataforma Fiji, diseñado para el procesamiento y análisis de imágenes científicas, y ampliamente utilizado en el análisis científico de imágenes. SmartRoot facilita el estudio del desarrollo radicular midiendo parámetros como la longitud, la ramificación y los ángulos de crecimiento. Es especialmente útil en estudios de plantas bajo condiciones controladas, como el crecimiento *in vitro*, donde se obtienen datos precisos a partir de imágenes capturadas de las raíces en crecimiento, permitiendo a los investigadores llevar a cabo análisis cuantitativos de diversas características morfológicas (Boudiar et al., 2020).

En el análisis de crecimiento radicular *in vitro*, SmartRoot permite monitorear detalladamente el crecimiento de las raíces en el tiempo, lo que es fundamental para estudios que evalúan el efecto de distintos tratamientos como fertilización o condiciones de estrés. La herramienta proporciona una cuantificación precisa de características como la longitud total y secundaria de las raíces, la densidad de ramificaciones y los ángulos de crecimiento, eliminando la necesidad de mediciones manuales. Además, su capacidad para analizar varios parámetros facilita estudios complejos sobre la arquitectura radicular, acelerando el proceso de análisis y reduciendo errores **(Sofa et al., 2020)**.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Evaluar la incidencia de Woody Plant Medium y ácido indol-3-butírico sobre el enraizamiento *in vitro* de explantes de *Myrcianthes rhopaloides*.

1.2.2 Objetivos específicos

- Identificar el tipo de explante que promueva la mayor masa radicular *in vitro* de *M. rhopaloides*
- Determinar el porcentaje de enraizamiento *in vitro* de explantes de *M. rhopaloides* a partir del medio Woody Plant Medium.
- Analizar el impacto del ácido indol-3-butírico en el proceso de enraizamiento *in vitro* de los explantes de *M. rhopaloides*

1.3 Hipótesis

1.3.1 Hipótesis nula

El Woody Plant Medium y las distintas concentraciones de ácido indol-3-butírico no tienen ningún efecto significativo sobre el enraizamiento *in vitro* de los explantes de *M. rhopaloides*.

1.3.2 Hipótesis alternativa

El Woody Plant Medium y las concentraciones de ácido indol-3-butírico tienen un efecto positivo y significativo sobre el enraizamiento *in vitro* de los explantes de *M. rhopaloides*, promoviendo una mayor eficiencia en su desarrollo radicular.

CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA

2.1 Materiales

2.1.1 Recursos institucionales

Laboratorios de la UODIDE y Laboratorios académicos de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, carrera de Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

2.1.2 Recursos materiales

Tabla 2

Recursos materiales del proyecto.

Material	Cantidad
Reactivos	
Ácido indol-3-butírico	3.5 g
Etanol al 70% (v/v)	1 L
Medio Murashige y Skoog	0,25 L
Medio WPM	1,5 L
NaOCL 0,15% (p/v)	1 L
Python (sulfato de cobre pentahidratado)	1 L
Tween 80 [®]	0,05 L
Material fungible	
Bisturí	2

Material	Cantidad
Frascos de tapa azul 1 L	4
Lampara de alcohol	4
Mango de acero inoxidable para bisturí	2
Pinzas de acero inoxidable	2
Probetas	2
Tubos de ensayo	100
Vasos de precipitación	4
Equipos	
Autoclave	1
Balanza analítica	1
Cámara de flujo laminar	1
Incubadora	1
Plancha de calentamiento	1
Refrigerador	1

2.2 Métodos

El trabajo de titulación fue experimental y se realizó en los laboratorios de la UODIDE de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, carrera de Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

2.2.1.1 Determinar el porcentaje de enraizamiento *in vitro* de explantes de *M. rhopaloides* a partir del medio Woody Plant Medium.

2.2.1.1.1 Traslado, selección y desinfección de muestras vegetales.

2.2.1.1.1.1 Selección de muestras.

La recolección de muestras se realizó a partir de especímenes saludables y en buen estado de árboles jóvenes, evitando aquellos con presencia de moho en la corteza, heridas visibles e insectos, así como muestras con marchitamiento evidente. Se procedió a cortar ramas de entre 5-10 cm de largo, este proceso se realizó con tijeras desinfectadas con alcohol al 70% (**Aguilera y Guedes, 2022**).



Figura 2. *Recolección de brotes de *M. rhopaloides**

Nota: Imagen de autoría propia.

2.2.1.1.2 Traslado del material vegetal.

El material vegetal (explantes) de *M. rhopaloides* fue recolectado en la ciudad de Ambato, específicamente en la parroquia San Bartolomé de Pinllo (**Anexo 1**). Dichas muestras fueron proporcionadas por el Sr. Patricio Mayorga, quien disponía en su propiedad de cinco ejemplares de esta especie. Las ramas se trasladaron a las instalaciones del laboratorio UODIDE en bolsas de sellado hermético, acompañadas de toallas humedecidas con agua destilada estéril aplicada mediante un atomizador (**Anexo 2**).

2.2.1.1.3 Desinfección de muestras vegetales.

La desinfección del material vegetal se llevó a cabo mediante un protocolo estructurado en dos etapas principales, siguiendo lo descrito por **Mongelós et al. (2020)**. En la primera etapa, el material fue lavado con agua jabonosa preparada mediante la dilución de 0,6 mL de Tween 80[®] en 60 mL de agua, con agitación constante (70rpm) durante 15 minutos. Posteriormente, se enjuagó el material tres veces con agua fría del grifo para eliminar residuos del detergente.

En la segunda etapa, se aplicó un tratamiento con fungicida PYTHON, utilizando una solución preparada previamente a una concentración de 1 mL de fungicida por cada 100 mL de agua estéril. El material vegetal fue sumergido en esta solución con agitación constante durante 2 horas. Al finalizar, se realizaron tres enjuagues consecutivos con agua fría del grifo para retirar cualquier residuo del fungicida.

Tras el tratamiento con el fungicida, el material vegetal fue sometido a una desinfección adicional con hipoclorito de sodio al 10%, obtenido de los Laboratorios INTEQ en la ciudad de Ambato. Para este procedimiento, se preparó una dilución al 2% de hipoclorito de sodio, en la cual el material fue sumergido y agitado de manera continua durante 15 minutos. Finalmente, se realizaron tres enjuagues consecutivos con agua estéril para asegurar la eliminación de cualquier remanente químico.



Figura 3. Desinfección de brotes de *M. rhopaloides*

Nota: Imagen de autoría propia.

En caso de presenciar contaminación de muestras se realizará un cultivo microbiológico en PDA con ampicilina, con el objetivo de obtener cultivos puros de hongos y minimizar el crecimiento bacteriano. El medio PDA, rico en nutrientes, proporcionó condiciones óptimas para el desarrollo micelial, mientras que la ampicilina, un antibiótico de amplio espectro, inhibió eficazmente el crecimiento de bacterias contaminantes. Para este procedimiento, las muestras provenientes de los explantes y el agar WPM contaminado fueron inoculadas en placas de PDA con ampicilina bajo condiciones asépticas. Posteriormente, las placas fueron incubadas a temperaturas entre 25 y 30 °C durante 7 días. Este enfoque permitió la observación

del crecimiento micelial, favoreciendo la separación y aislamiento de colonias fúngicas individuales para su posterior identificación y análisis.

2.2.1.1.2 Preparación de medios de cultivo.

La preparación del medio de cultivo WPM implicó la disolución de sales minerales, vitaminas y sacarosa como fuente de carbono. Adicionalmente, en ciertos casos, se incorporaron reguladores de crecimiento, como fitohormonas, para mejorar el desarrollo de los explantes. El pH de la solución se ajustó a un rango óptimo, que generalmente osciló entre 5.6 y 5.8, antes de añadir un agente gelificante, como el agar. Posteriormente, el medio fue esterilizado mediante autoclave a alta presión y temperatura, con el fin de eliminar cualquier posible contaminación microbiana. Una vez esterilizado, el medio se vertió en tubos de ensayo, donde los explantes fueron inoculados bajo condiciones estrictamente asépticas. En el caso específico de *M. rhopaloides*, el medio WPM se ajustó a un rango de pH de 5.5 a 6.5 para proporcionar las condiciones óptimas que favorecieron su desarrollo adecuado. **(Jayusman et al., 2022).**



Figura 4. *Dosificación de medios de cultivo.*

Nota: Imagen de autoría propia

2.2.1.1.3 Siembra e incubación de material vegetal.

Con los medios dosificados en los tubos de ensayo, se procedió a sembrar los brotes de *M. rhopaloides*, este proceso se realizó dentro de la cámara de flujo. Se realizaron los últimos cortes en zona estéril. Para evitar contaminación todo el material que estuvo en contacto tanto con los medios como con los brotes estuvieron sumergidos en alcohol al 70% y posteriormente flameados.



Figura 5. *Siembra de explantes de M. rhopaloides*

Nota: Imagen de autoría propia.

El material vegetal sembrado en cada medio fue incubado a una temperatura en el rango de 25 a 30 °C, teniendo en cuenta que las condiciones de luz fueron de 16 horas y 8 horas de oscuridad, durante un tiempo estimado de 4 a 6 semanas (Phillips y Garda, 2019).

2.2.1.1.4 Análisis de datos.

Los datos tomados serán analizados mediante prueba de medias, para los cuáles se tomarán los resultados significativos, se analizará una prueba Tuckey (0,05) para separador de medias (Machado et al., 2020).

2.2.1.2 Analizar el impacto del ácido indol-3-butírico en el proceso de enraizamiento *in vitro* de los explantes de *M. rhopaloides*.

2.2.1.2.1 Diseño experimental.

En esta investigación se utilizó un diseño factorial $1 \times 1 \times 2$, con tres réplicas por tratamiento, lo que dio un total de dos tratamientos diferentes. Esto se debió a que el estudio evaluó el efecto de un medio de cultivo específico (WPM) y una fitohormona (AIB en tres concentraciones: 1,5 mg/L, 2,0 mg/L y 2,5 mg/L) en dos tipos de explantes (internodal y apical) en el enraizamiento *in vitro* de *M. rhopaloides*. Al contar con un único medio de cultivo y una única fitohormona, el factor variable en este diseño fue el tipo de explante, lo que resultó en dos combinaciones distintas (internodal y apical). Cada combinación se replicó tres veces para garantizar la validez y confiabilidad de los resultados, permitiendo así evaluar de manera precisa el impacto del tipo de explante en el proceso de enraizamiento (Melo et al., 2020).

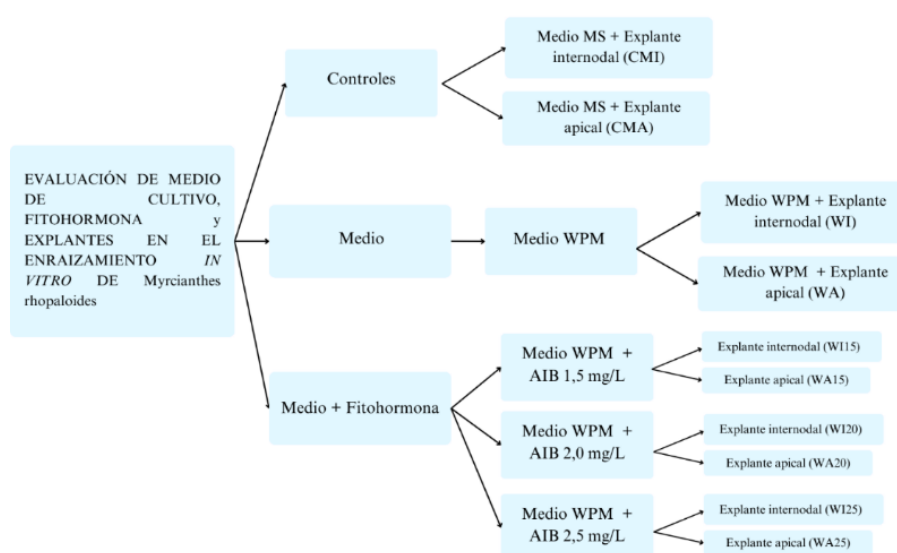


Figura 6. Diseño experimental del proyecto.

Nota: En la imagen están descritos cada uno de los factores y tratamientos del estudio a realizar, se encuentran implementados los códigos con los cuales se estarán reconociendo cada ensayo.

Para determinar la variable del porcentaje de contaminación, se realizaron observaciones frecuentes de los tratamientos desde el primer día de siembra hasta 15 días después, para esto se usó la siguiente ecuación:

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

(Ecuación 1)

Para la variable del porcentaje de oxidación, se consideró la necrosis de explantes, esto está directamente ligado al estrés que sufre el material vegetal frente a los agentes desinfectantes. La necrosis, es expresada como un oscurecimiento de los explantes o presencia de tonalidades amarillas, este factor fue evaluado de manera visual desde el día 0 (día de siembra vegetal) hasta 7 días después. Para esto se utilizó la siguiente ecuación:

$$\%Oxidación = \frac{\text{Número de explantes oxidados}}{\text{Total de explantes}} \times 100$$

(Ecuación 2)

Por otro lado, el porcentaje de viabilidad se obtuvo al contabilizar los explantes que se establecieron con éxito desde el día 0 hasta los 45 días posteriores, esto fue calculado con la siguiente ecuación:

$$\%Viabilidad = \frac{\text{Número de explantes vivos}}{\text{Total explantes}} \times 100$$

(Ecuación 3)

2.2.1.2.2 Preparación del medio de cultivo y adición de la fitohormona.

El medio de cultivo se preparó según lo descrito en el apartado 2.1.3.1.2. La diferencia radica en la adición de la fitohormona AIB se realizó previo al ajuste de pH del medio de cultivo. Las dosis añadidas fueron de 1,50 mg/L, 2,00 mg/L y 2,50 mg/L (**Palomino et al., 2022**).



Figura 7. Dosificación WPM + AIB en tubos de ensayo.

Nota: Imagen de autoría propia.

2.2.1.2.3 Incubación del material vegetal.

El material vegetal sembrado en cada medio fue incubado a una temperatura en el rango de 25 a 30 °C, teniendo en cuenta que las condiciones de luz fueron de 16 horas y 8 horas de oscuridad, durante un tiempo estimado de 4 a 6 semanas (**Phillips y Garda, 2019**).

2.2.1.2.4 Análisis de respuesta ante adicción de fitohormonas.

Se realizaron tres réplicas empleando dos tipos de explantes, internodales y apicales, combinados con tres diferentes concentraciones de fitohormonas. La cuantificación se llevó a cabo midiendo la longitud de los brotes en centímetros mediante el uso de una regla. Para ello, se consideró que cada brote estaba cultivado individualmente en un tubo de ensayo. La longitud de las raíces fue medida desde la base del medio de cultivo con el objetivo de cuantificar la elongación, como se ilustra en la **Figura 8**.

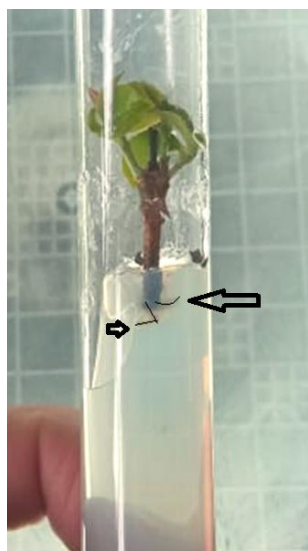


Figura 8. *Medición de raíces.*

Nota: Imagen de autoría propia.

2.2.1.3 Identificar el tipo de explantes que promuevan la mayor masa radicular *in vitro* de *M. rhopaloides*

La identificación del explante promotor de mayor masa radicular se llevó a cabo mediante un análisis comparativo de los explantes y su proceso de crecimiento a lo largo del desarrollo experimental. Por otro lado, el programa SmartRoot fue la herramienta usada en este objetivo, ya que, al cargar en su base de datos las imágenes de formato JPG de evidencia de cada tratamiento, el programa analizó las imágenes y resaltó las diferencias de crecimiento radicular entre los distintos explantes.

2.2.1.3.1 Análisis de datos

Los datos tomados fueron analizados mediante una prueba de medias, en la cual se consideraron los resultados significativos. Además, se aplicó una prueba de Tukey (0,05) como método para separar las medias (**Machado et al., 2020**). Se utilizó el paquete estadístico del programa Spyder, donde los datos fueron procesados y se presentaron tablas que indicaron la eficiencia de cada tratamiento probado. SmartRoot proporcionó la longitud total de las raíces, el software permitió realizar un análisis detallado de esta métrica a lo largo del tiempo, lo cual resultó útil para estudios longitudinales del crecimiento radicular (**Pinto, 2020**).

2.2.1.3.2 Manejo del programa SmartRoot.

El proceso incluyó la descarga e instalación de ImageJ, la incorporación de la carpeta de SmartRoot en el directorio de complementos, y la verificación de la compatibilidad de los componentes. Posteriormente, se abordó el uso de las herramientas principales del programa, las cuales incluyen funciones de trazado manual y semiautomático, marcadores para la anotación de características específicas, y opciones para registrar cambios en series temporales de imágenes. Las imágenes fueron preparadas en formato de escala de grises y cargadas adecuadamente en la interfaz de SmartRoot. Asimismo, se emplearon herramientas como el trazado de raíces laterales y los anclajes de registro para analizar con precisión el crecimiento y la ramificación de las raíces. Finalmente, los datos obtenidos fueron exportados a archivos o bases de datos para su análisis posterior. Se emplearon funciones avanzadas del software para generar histogramas, gráficos y tablas que permitieron evaluar métricas como la densidad radicular y el crecimiento longitudinal.

CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Determinar el porcentaje de enraizamiento *in vitro* de explantes de *M. rhopaloides* a partir del medio Woody Plant Medium.

3.1.1 Recolección de datos.

En la **Tabla 3** se observan los resultados para los explantes viables, explantes oxidados y explantes contaminados. De un total de 24 explantes analizados, el 62,50% (15 explantes) mostró viabilidad al desarrollar raíces en un período de cuatro semanas, lo que evidenció su capacidad de regeneración. Las primeras hojas emergieron en tres semanas, reflejando un desarrollo inicial favorable bajo las condiciones del medio WPM. Sin embargo, estos resultados contrastan con los obtenidos por **González et al. (2018)**, quienes reportaron un mayor porcentaje de viabilidad en *Myrcianthes pungens* (70-80%) al emplear medios suplementados con antioxidantes como el ácido ascórbico.

Tabla 3

Resultados viabilidad, oxidación y contaminación de los explantes de M. rhopaloides

	Número de explantes	Porcentaje
Explantes contaminados	4	16,67%
Explantes oxidados	5	20,83%
Explantes viables	15	62,50%
Total	24	100%

Nota: Se representa los valores vs porcentajes de explantes contaminados, oxidados y viables de *M. rhopaloides*.

Los resultados muestran que el 62,50% de los explantes fueron viables, el 20,83% presentaron oxidación y el 16,67% contaminación. Un análisis de chi-cuadrado aplicado a estas proporciones reveló diferencias estadísticamente significativas entre las categorías ($p < 0,05$), lo que indica que el protocolo de cultivo favoreció la viabilidad de los explantes en comparación con los efectos adversos de la oxidación y la contaminación. Esto coincide con hallazgos de **González et al. (2018)** quienes lograron mayores viabilidades ajustando los antioxidantes en medios similares. Adicionalmente, **Ruiz et al. (2019)** destacaron que protocolos más estrictos de desinfección, incluyendo el uso de agentes antimicrobianos y antibióticos, pueden disminuir significativamente la contaminación, lo que podría implementarse para optimizar los resultados en *M. rhopaloides*.

3.1.2 Eficiencia del medio Woody Plant Medium.

Los explantes seleccionados fueron segmentos nodales con dos yemas axilares, las cuales fueron sembradas en medio WPM y como control fue usado el medio Murashige y Skoog. Los explantes presentaron apenas un 20,83% de oxidación con un 20,83% de florecimiento. Se observó la interacción entre el medio WPM con los explantes internodales (**Figura 9**) muestra el crecimiento de brotes internodales en un medio de cultivo Woody Plant Medium (WPM) durante la semana 2,5 posterior a la siembra. Este medio de cultivo ha sido ampliamente utilizado para el establecimiento y proliferación de cultivos *in vitro* en especies leñosas y plantas perennes debido a su composición nutricional balanceada, que incluye macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y un regulador de pH adecuado para el crecimiento de tejidos vegetales.



Figura 9. *Brotes internodales en medio WPM en crecimiento Semana 3.*

Nota: Autoría propia.

El desarrollo inicial favorable de las yemas observado en la figura puede atribuirse a la eficacia del WPM en la promoción de la organogénesis de explantes vegetales. Este resultado destaca la adecuada interacción entre los nutrientes del medio y el potencial morfogénico del explante, alineándose con investigaciones de **Kumar et al. (2017)**, quienes reportaron que medios balanceados en macro y micronutrientes optimizan la formación de brotes en especies leñosas. Además, la presencia de fitohormonas en el medio, como citoquininas (frecuentemente incluidas en este tipo de ensayos), podría haber estimulado la división celular y la formación de meristemos apicales. El éxito en la regeneración de brotes durante la semana 2,5 es un indicador positivo del estado fisiológico del explante, que probablemente estuvo influenciado por factores como la asepsia en el establecimiento, las condiciones controladas de luz y temperatura, y la composición química del medio. Sin embargo, es importante considerar que el desarrollo continuo de estas yemas dependerá de la consistencia de estas condiciones y de ajustes en la suplementación de hormonas, como la incorporación de auxinas para promover el enraizamiento en etapas posteriores.

3.1.3 Aislamiento e identificación de hongos (muestras contaminadas).

Ya que el 16,67 % de explantes se contaminaron se procedió a realizar el aislamiento de muestras seleccionadas, como se puede observar en la **Figura 10** se evidenció la contaminación del explante, la cual fue detectada a los 7 días posteriores a su siembra. La muestra contaminada presentó un desarrollo visible de material fúngico, lo que sugiere una contaminación inicial durante el proceso de manipulación, siembra o condiciones del medio de cultivo. Este crecimiento indeseado comprometió la asepsia de la muestra y, por consiguiente, fue necesario proceder con el aislamiento del microorganismo contaminante.



Figura 10. Brote *in vitro* contaminado 2WA de *M. rhopaloides*

Nota: Imagen de autoría propia

En la **Figura 11** se mostró el resultado del hongo aislado, el cual fue transferido a un medio de cultivo específico PDA, y dejado crecer durante un período de 15 días a una temperatura constante de 28 °C. El cultivo en PDA permitió el desarrollo radial uniforme del hongo, observándose una estructura bien definida con un núcleo central oscuro que probablemente correspondió a una zona de esporulación, rodeada por un halo más claro que representó el micelio vegetativo. Este patrón morfológico es característico de hongos filamentosos y sugiere

la producción de estructuras reproductivas y posiblemente de metabolitos secundarios durante su desarrollo.



Figura 11. Aislamiento hongo muestra 2WA en PDA.

Nota: Imagen de autoría propia

El aislamiento permitió obtener un cultivo puro del hongo presente en la contaminación inicial. Las condiciones seleccionadas, como el uso de medio PDA y un ambiente controlado a 28 °C, favorecieron el crecimiento uniforme del hongo. Esto concuerda con metodologías descritas por **Debnath (2011)**, quien resalta la importancia de condiciones específicas para la proliferación controlada de microorganismos asociados a cultivos vegetales *in vitro*.

3.2 Analizar el impacto del ácido indol-3-butírico en el proceso de enraizamiento *in vitro* de los explantes de *M. rhopaloides*

Como se puede observar en la **Tabla 4** el número de explantes oxidados fue mayor que en la **Tabla 3** los datos revelan un efecto positivo en el alargamiento y la formación de raíces, aunque también se observó un aumento en los índices de oxidación. Esto sugiere que, si bien el AIB promueve el desarrollo radicular, es crucial ajustar sus concentraciones para minimizar efectos adversos. Estos resultados están alineados con investigaciones como la de **Palomino et al.**

(2022), quienes destacan la importancia de las concentraciones óptimas de auxinas para maximizar la eficiencia del enraizamiento.

Tabla 4

Porcentajes de contaminación, viabilidad y oxidación de explantes de M. rhopaloides en WPM+AIB.

	Número de explantes	Porcentaje
Explantes contaminados	8	22,22%
Explantes oxidados	12	33,33%
Explantes viables	16	44,44%
Total	36	100%

Nota: Autoría propia.

Se puede observar en **Tabla 5** diferencias significativas entre las concentraciones de AIB y los tipos de explante. Los análisis estadísticos revelaron que los explantes tratados con 0,2 mg/mL de AIB, las cuales mostraron mejores resultados en longitud de raíces en comparación con 0,15 mg/mL, particularmente en las semanas finales. Los explantes WI superaron ligeramente a los WA en términos de crecimiento, con diferencias más notables durante las primeras semanas. Los resultados evidenciaron un crecimiento sostenido en todas las combinaciones de concentración y tipo de explante, con una estabilización hacia la sexta semana. Esto concuerda con estudios de **García et al. (2010)**, quienes sugieren que el crecimiento radicular in vitro tiende a estabilizarse después de un período inicial de rápida elongación.

Tabla 5*Resultados longitud de raíces.*

Concentración AIB (mg/mL)	Explante	Longitud (mm)			
		Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
0,15	0WA	0,09	0,1	0,13	0,14
0,15	0WI	0,1	0,12	0,13	0,14
0,15	1WA	0,05	0,06	0,07	0,08
0,2	1WI	0,1	0,11	0,12	0,13
0,15	2WA	0,09	0,1	0,11	0,12
0,2	2WA	0,11	0,12	0,13	0,14
0,15	2WI	0,11	0,12	0,13	0,14
0,2	2WI	0,09	0,1	0,11	0,12
0,2	3WA	0,05	0,06	0,07	0,08
0,2	3WI	0,09	0,1	0,12	0,14
0,15	4WA	0,08	0,09	0,1	0,12
0,15	4WI	0,11	0,12	0,13	0,13
0,2	4WI	0,09	0,1	0,11	0,13
0,15	5WA	0,1	0,11	0,12	0,13
0,2	5WA	0,05	0,06	0,07	0,07
0,2	5WI	0,09	0,09	0,11	0,13

Nota: Autoría propia.

En la **Figura 12**, se observa que el tipo de explante influye de manera significativa en el crecimiento radicular a lo largo de las semanas evaluadas. Los explantes internodales (línea amarilla) presentan un mayor incremento en la longitud promedio de raíces en comparación con los explantes apicales (línea verde) durante todo el periodo de observación. Este patrón indica que los explantes internodales poseen una mayor capacidad para la formación y elongación radicular, lo que podría explicarse por características anatómicas y fisiológicas específicas, tal como lo han descrito **Debnath (2011)** y **Kumar et al. (2017)** en estudios similares. Además, el crecimiento radicular en los explantes internodales es más consistente y pronunciado, alcanzando valores superiores a 0,12 mm en la sexta semana, mientras que los explantes apicales apenas superan los 0,10 mm en el mismo periodo. Este resultado destaca la

importancia de seleccionar adecuadamente el tipo de explante en experimentos de enraizamiento para maximizar el desarrollo radicular.

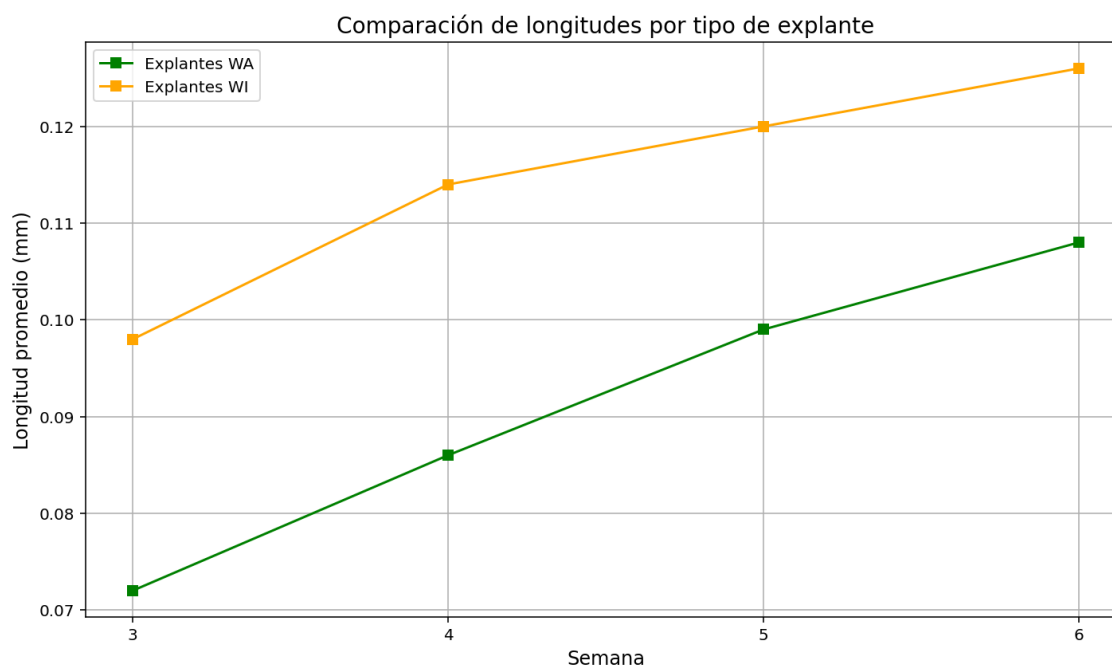


Figura 12. Comparación de longitudes por tipo de explante.

Nota: Figura de autoría propia

En la **Figura 13** se muestra el efecto de dos concentraciones de ácido indol-3-butírico (AIB), 0,15 mg/mL y 0,2 mg/mL, sobre la longitud promedio de las raíces en un cultivo *in vitro* a lo largo de seis semanas. Se observa que la concentración de 0,2 mg/mL (línea roja) genera un mayor crecimiento promedio en comparación con la concentración de 0,15 mg/mL (línea azul), mostrando una tendencia constante de mayor longitud durante todas las semanas. En investigaciones realizadas con especies de la familia *Myrtaceae*, como *Eucalyptus globulus* y *Myrtus communis*, se ha encontrado que concentraciones de AIB alrededor de 0,2 mg/mL promueven un enraizamiento efectivo y un buen desarrollo de raíces adventicias en cultivos *in vitro*. El comportamiento observado en el gráfico, donde la concentración de 0,2 mg/mL de AIB promueve un mayor crecimiento radicular, coincide con lo reportado en estudios previos

(Bhardwaj et al., 2018; Bhoi et al., 2020), que destacan la efectividad de esta concentración en el enraizamiento de especies leñosas.

Aunque concentraciones más bajas de AIB (por ejemplo, 0,1–0,15 mg/mL) pueden inducir el enraizamiento, estudios han mostrado que concentraciones en torno a 0,2–0,5 mg/mL tienden a ser más efectivas para obtener raíces más largas y mejor estructuradas en algunas especies de esta familia. En varios experimentos con especies de *Myrtaceae*, el efecto positivo del AIB en concentraciones cercanas a 0,2 mg/mL se observa generalmente entre las semanas 4 y 6 de cultivo, lo que coincide con el aumento progresivo en la longitud observado en el gráfico.

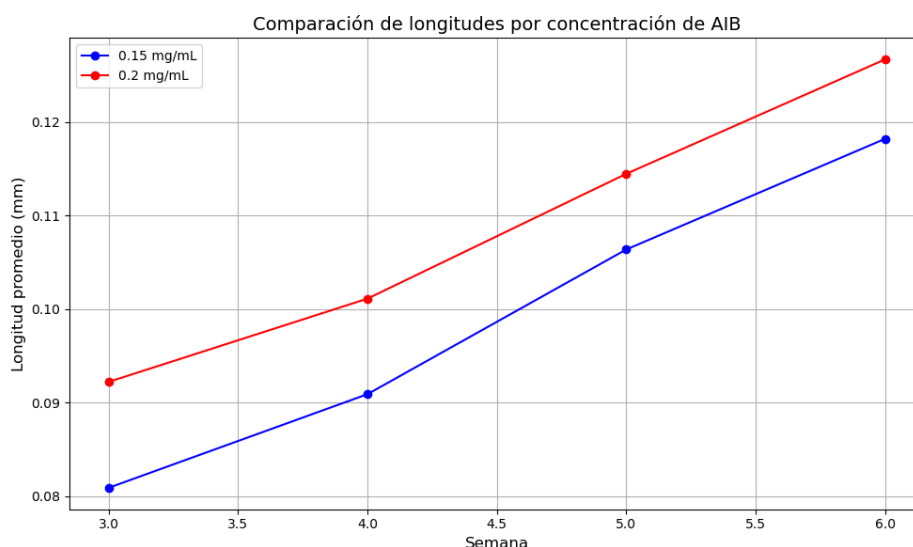


Figura 13. Comparación longitudes por concentración de AIB.

Nota: Figura de autoría propia

Los resultados obtenidos mediante la prueba de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$) indicaron que los datos no se ajustan a una distribución normal. Sin embargo, la aplicación de ANOVA, aunque no mostró diferencias significativas ($p = 0,10$), sugiere la necesidad de incrementar el tamaño de muestra y optimizar las condiciones experimentales para detectar posibles variaciones en los tratamientos, como también lo proponen Machado et al. (2020). Sin embargo, se utilizó un

ANOVA, cuyo p-valor de 0.10 sugiere que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los grupos. Además, las comparaciones múltiples con la corrección de Bonferroni refuerzan esta conclusión, ya que el p-valor ajustado (0.20) no alcanza significancia estadística. Esto coincide con lo reportado en investigaciones previas sobre el crecimiento *in vitro* de raíces, como las de **Machado et al. (2020)**, quienes encontraron que las diferencias en la respuesta a tratamientos hormonales suelen ser sutiles y no siempre significativas, dependiendo de factores como el tipo de explante y las condiciones de cultivo. Sin embargo, la ausencia de diferencias significativas en el presente estudio podría atribuirse a un tamaño de muestra limitado o a variaciones en las condiciones ambientales, lo que resalta la necesidad de replicar el experimento con un diseño más robusto para confirmar estos hallazgos.

3.3 Identificar el tipo de explantes que promuevan la mayor masa radicular *in vitro* de *M. rhopaloides*

Cada imagen fue subida al programa SmartRoot a partir de la semana 3, esto debido a que a los 21 días de siembra *in vitro* se presenciaron los primeros brotes de hojas nuevas tanto en los explantes internodales como en los explantes apicales. En la **Figura 14** se puede observar primeros brotes a partir de las yemas internodales.

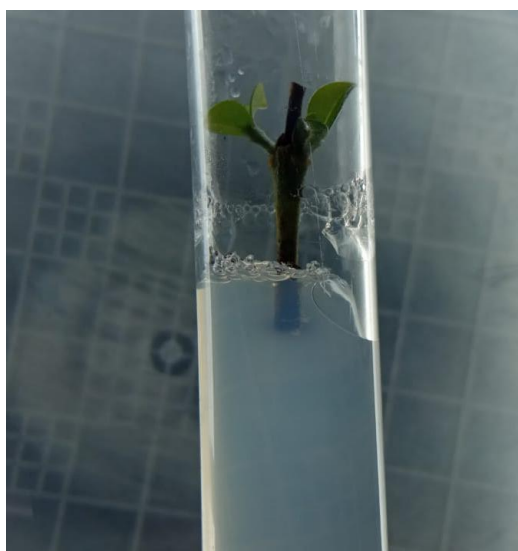


Figura 14. *Explante internodal semana 3, primeros brotes.*

Nota: Imagen de autoría propia

Por otro lado, en la **Figura 15** subida a SmartRoot muestra el desarrollo radicular de un explante internodal de *M. rhopaloides* a la semana cinco de cultivo en medio WPM suplementado con 0.2 mg/mL de AIB. En la imagen, se observa la formación de una raíz en crecimiento activo, destacada mediante la herramienta de análisis digital. La estructura radicular emerge de manera clara desde el explante, lo que refleja una respuesta favorable a las condiciones del medio de cultivo y la concentración hormonal aplicada. Este resultado evidencia que la concentración de AIB seleccionada promueve el inicio del desarrollo radicular sin generar una oxidación excesiva ni comprometer la viabilidad del material vegetal, confirmando su efectividad para la micropropagación *in vitro* de esta especie. La posición del explante dentro del tubo de ensayo, así como la claridad del medio, sugiere un entorno controlado propicio para el desarrollo radicular óptimo.

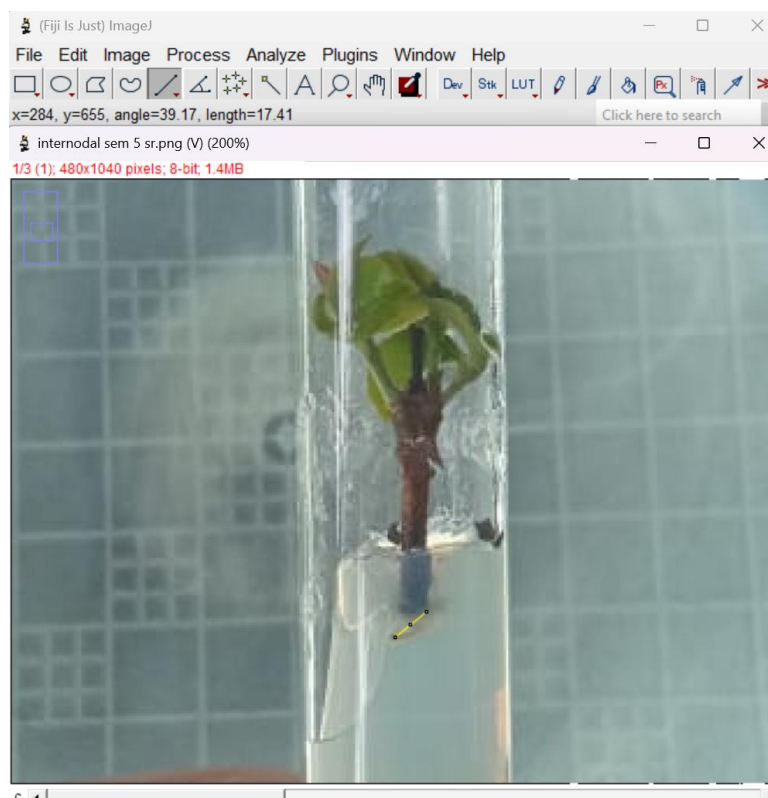


Figura 15. Explante internodal de 5 semanas de crecimiento en SmartRoot.

Nota: Imagen de autoría propia

El **Figura 16** muestra la evolución temporal de la longitud promedio de raíces, medida mediante SmartRoot, en explantes apicales (WA) e internodales (WI) de *M. rhopaloides* bajo concentraciones de 0.15 mg/mL y 0.2 mg/mL de ácido indol-3-butírico. (AIB) durante un período de tres semanas (de la tercera a la sexta semana). Se observa una tendencia de crecimiento constante en todas las condiciones, con los explantes internodales (WI) mostrando un mayor desarrollo radicular en ambas concentraciones en comparación con los explantes apicales (WA). En particular, la condición con 0.2 mg/mL para los explantes internodales (línea roja) muestra el mayor crecimiento promedio, alcanzando una longitud cercana a 0.13 mm en la semana seis, mientras que los explantes apicales con la misma concentración presentan una longitud ligeramente inferior. (línea verde). A su vez, los explantes tratados con 0,15 mg/mL muestran una evolución menos pronunciada, manteniéndose por debajo de 0,12 mm. Este resultado sugiere que la concentración más alta de AIB (0,2 mg/mL) promueve un desarrollo radicular más eficiente, especialmente en explantes internodales, en concordancia con los

estudios de **Bhoi et al. (2020)**, quienes documentaron un mayor enraizamiento en especies leñosas con concentraciones similares de auxinas sintéticas el comportamiento diferencial entre explantes apicales e internodales indica una mayor capacidad de respuesta de los internodales a las condiciones del cultivo, posiblemente debido a su arquitectura o diferenciación tisular. Estos resultados subrayan la importancia de seleccionar el tipo de explante y la concentración adecuada de fitohormona para optimizar el proceso de micropropagación en esta especie.

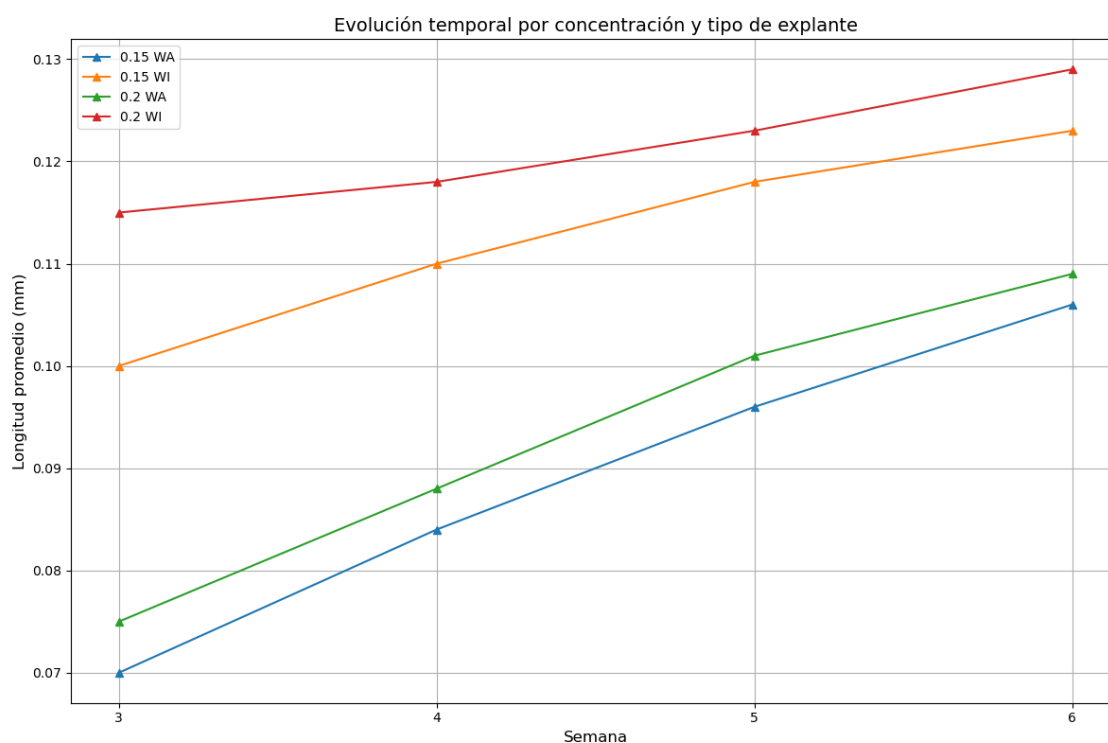


Figura 16. *Evolución temporal por concentración y tipo de explantes.*

Nota: Figura de autoría propia

Según **Bhardwaj et al. (2018)**, el AIB es una de las auxinas sintéticas más efectivas para estimular el enraizamiento en explantes vegetales debido a su estabilidad química y su capacidad para promover la formación de raíces adventicias. Los resultados del gráfico, que muestran un crecimiento significativo en la longitud de las raíces con la concentración de 0,2 mg/mL, coinciden con estos hallazgos. De manera similar, **Bhoi et al. (2020)** destacan que

concentraciones de AIB superiores a 0,1 mg/mL favorecen un desarrollo radicular más robusto en especies leñosas.

Investigaciones como las de **Debnath (2011)** y **Kumar et al. (2017)** documentan que los explantes internodales suelen mostrar una mayor capacidad para el enraizamiento en comparación con los apicales debido a la presencia de tejidos diferenciados que responden mejor a las fitohormonas. Este patrón se refleja claramente en el gráfico, donde los explantes internodales presentan un mayor crecimiento radicular en ambas concentraciones. El trabajo de **García et al. (2010)** resalta la importancia de seleccionar tanto el tipo de explante como la concentración hormonal adecuada para maximizar la eficiencia del cultivo *in vitro*. El incremento en la longitud radicular de los explantes internodales tratados con 0,2 mg/mL de AIB sugiere que esta combinación es óptima para la micropropagación de *M. rhopaloides*, en línea con estrategias recomendadas por **García et al. (2010)** para maximizar la eficiencia en cultivos *in vitro*.

CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- Se logró una tasa de viabilidad del 62,5% de los explantes cultivados en el medio WPM, reflejando su eficacia como sustrato para la inducción del enraizamiento. Los explantes contaminados representaron un 16,67%, mientras que el 20,83% mostró signos de oxidación. Este equilibrio entre viabilidad y factores adversos resalta la necesidad de mejorar las condiciones de asepsia y optimizar la concentración de nutrientes para minimizar el impacto de la oxidación en el desarrollo inicial.
- El uso de AIB a una concentración de 0,2 mg/mL promovió un crecimiento radicular más eficiente en comparación con concentraciones menores (0,15 mg/mL). El crecimiento continuo de raíces fue especialmente notable entre las semanas 4 y 6, demostrando que concentraciones cercanas a 0,2 mg/mL resultan óptimas para el desarrollo de raíces adventicias en esta especie. Sin embargo, se observó un incremento en la oxidación del explante asociado a concentraciones más elevadas de AIB, lo que subraya la necesidad de equilibrar su uso para maximizar los beneficios y minimizar efectos adversos.
- Los resultados obtenidos indican que los explantes internodales de *M. rhopaloides* presentan un desarrollo radicular significativamente superior en comparación con los explantes apicales. Este comportamiento se evidencia mediante un mayor incremento en la longitud promedio de las raíces durante todo el periodo de observación experimental. Las propiedades anatómicas y fisiológicas inherentes a su origen podrían explicar la consistencia en el crecimiento. La adaptabilidad de los explantes internodales al medio WPM favoreció un crecimiento más pronunciado, lo que reafirma su idoneidad para estudios futuros enfocados en el cultivo *in vitro*.

4.2 Recomendaciones

- Es crucial optimizar las condiciones de asepsia durante la preparación y manejo del material vegetal para reducir las tasas de contaminación y oxidación. Esto implica una desinfección rigurosa de los explantes y el mantenimiento de un ambiente estéril en todas las etapas del proceso experimental. La aplicación de técnicas avanzadas de control de contaminación también podría ser beneficiosa para maximizar la viabilidad de los explantes.
- Se recomienda priorizar el uso de explantes internodales en experimentos futuros debido a su superioridad en el desarrollo radicular y la consistencia en el crecimiento *in vitro*. Los resultados obtenidos evidencian que estos explantes permiten una mayor longitud y densidad de raíces, factores clave para la micropropagación eficiente de *M. rhopaloides*. La implementación de esta recomendación podría contribuir a una mejora sustancial en la productividad y eficiencia del cultivo de esta especie vegetal.
- Realizar pruebas adicionales sobre el efecto de combinaciones de fitohormonas permitirá maximizar el rendimiento del cultivo *in vitro*. La combinación de auxinas con otras fitohormonas podría fomentar un crecimiento más robusto y uniforme, así como minimizar los efectos adversos asociados a concentraciones elevadas de AIB.
- Explorar el uso de otros medios de cultivo complementarios que potencien el efecto del Woody Plant Medium (WPM) podría ser una estrategia efectiva para mejorar las tasas de viabilidad de los explantes. Esta exploración debería incluir el análisis de combinaciones de nutrientes y fitohormonas que puedan potenciar el desarrollo radicular y reducir el tiempo de crecimiento.

MATERIALES DE REFERENCIA

Referencias Bibliográficas

- Aguilera, N., y Guedes, L. (2022). Manual de técnicas anatómicas histoquímicas para el análisis de muestras vegetales.
- Andrade, A., Gómez, L., Torres, Y., y Aguilera-Arango, G. (2021). Evaluation of growing media for the *in vitro* establishment, multiplication and rooting of blackberry (*Rubus glaucus benth.*). Chilean Journal of Agricultural and Animal Sciences, 37(2), 117–127. <https://doi.org/10.29393/CHJAAS37-14EMAG40014>
- Bhardwaj, DR, Bhardwaj, S. y Negi, R. (2018). Efecto del ácido indol butírico y los medios de enraizamiento en la propagación vegetativa de especies de árboles forestales: una revisión. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 7 (6), 2950–2954.
- Bhoi, BK, Singh, S. y Choudhary, K. (2020). Efecto de los reguladores del crecimiento de las plantas en el enraizamiento y la brotación de cultivos hortícolas: una revisión. Revista internacional de estudios químicos, 8 (4), 3
- Bustamante, K., Rocha, S., Sharry, S., Guerra, M., y Niella, F. (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>
- Castillo, A. (2008). Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. *Las Brujas, Uruguay: AR-VITRO, INIA.*
- Castillo, C., Gutiérrez, M., Buenrostro, M., Cetina, V., y Cadena, J. (2019). Regeneración de plantas de *Paulownia elongata* Steud. por organogénesis directa. Revista Mexicana de Ciencias Forestales, 3(10). <https://doi.org/10.29298/rmcf.v3i10.528>
- Cueva, E., Lozano, D., y Yaguana, C. (2019). Effect of the altitudinal gradient in the floristic composition, structure and arboreal biomass of the andean dry forest, Loja, Ecuador. Bosque, 40(3). <https://doi.org/10.4067/S0717-92002019000300365>
- Da Silva, P., Rispoli, R., Minozzo, M., Jobim, L., Junges, M., y Stefenon, V. (2014). A regenerative route for *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) through *in vitro* germination and

- micropropagation. *Annals of Forest Research*, 57(1), 39–45.
<https://doi.org/10.15287/afr.2014.179>
- Debnath, S (2011). Influencia de la época de explantación y de los reguladores de crecimiento en la micropropagación del arándano de arbusto bajo. *Cultivo de células, tejidos y órganos de plantas*, 104(3), 3. <https://doi.org/10.1007/s11-0-9826-3>
- Duchefa Biochemie. (2024). Murashige y Skoog Medium (Micro and Macro elements). <http://apps.who.int/poiso>
- Eras, V., Moreno, J., Yaguana, M., Poma, R., y Paredes, D. (2019). Balance hormonal para la fase de brotación y enraizamiento *in vitro* de explantes de *Cinchona Officinalis* L., provenientes de relictos boscosos de la provincia de Loja. *Bosques Latitud Cero*, 9(1).
- Franco, L., Hermann, B., Fritsche, Y., y Stefenon, V. (2024). A four steps protocol for *in vitro* propagation of *Eugenia uniflora* L. (*Myrtaceae*). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 71(5). <https://doi.org/10.1007/s10722-023-01741-2>
- García, R., Quiroz, K., Carrasco, B., y Caligari, P. (2010). Cultivo de tejidos vegetales: estado actual, oportunidades y desafíos. *Revista Chilena de Investigación Agropecuaria*, 70 (3. <https://doi.org/10.4/S-583>
- González, A., Fernández, M., y López, J. (2018). Optimización del cultivo *in vitro* de *Myrcianthes pungens* mediante ajustes en medios de cultivo y uso de antioxidantes. *Revista de Biotecnología Vegetal*, 15(3), 45-52.
- Gopu, C., Chakilam, C., Chirumamilla, P., Vankudoth, S., y 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>
- Guerrero, P., y Pozo, K. (2016). Evaluación de la actividad antioxidante bioautografica de cinco variedades de aceites esenciales andinos (*Aristeguietia glutinosa*; *Myrcianthes rhopaloides*; *Ambrosia arborescens*; *Lantana camara*; *Minthostachys mollis*). In Tesis.
- Jayusman, Hakim, L., y Dalimunthe, A. (2022). Season, basal media and plant growth regulators effect in wood plant *in vitro* propagation: a comprehensive review. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1115(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1115/1/012051>

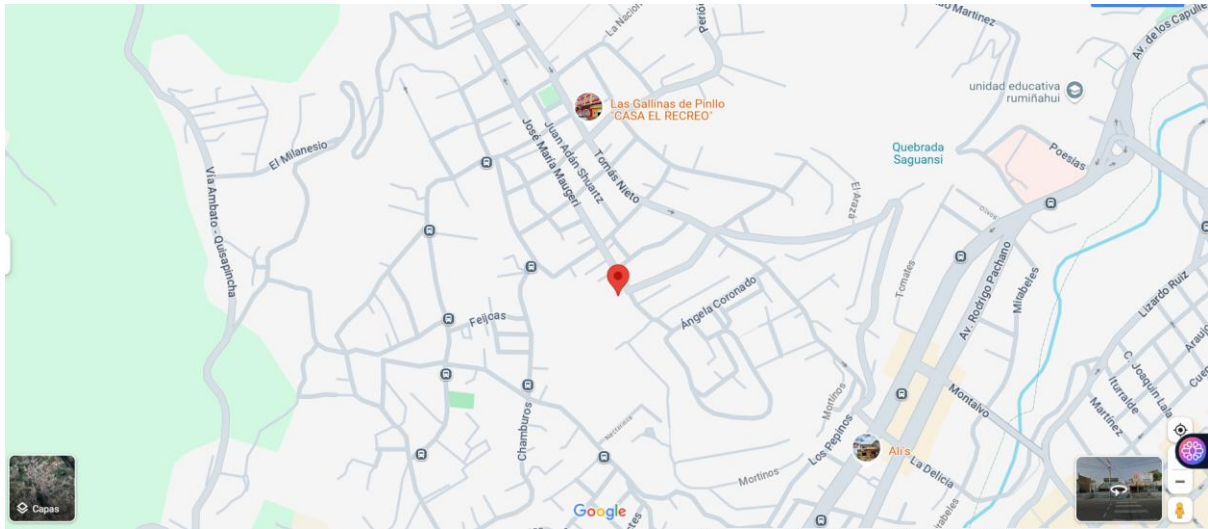
- Jha, S., y Halder, M. (2023). Medicinal Plants: Biodiversity, Biotechnology and Conservation. https://doi.org/10.1007/978-981-19-9936-9_30
- Kumar, S., Shekhawat, M y Devda, S (2017). Propagación *in vitro* y enraizamiento *ex vitro* de especies de plantas de importancia medicinal. Indian Journal of Biotechnology.
- Liofilchem. (2016). Potato Dextrose Agar. www.liofilchem.net
- López, A., Antón, B., Lovera, M., Arquero, O., Trapero, A., y Agustí, C. (2024). Identification and pathogenicity of *Fusarium* species associated with wilting and crown rot in almond (*Prunus dulcis*). Scientific Reports, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-56350-5>
- Machado, J., Degenhardt, J., Maia, F., y Quoirin, M. (2020). Micropropagation of *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg (Myrtaceae), a medicinal tree from the Brazilian Atlantic Forest. Trees - Structure and Function, 34(3). <https://doi.org/10.1007/s00468-020-01958-z>
- Marsola, S., Jorge, L., Meniqueti, A., Bertéli, M., de Lima, T., Bezerra, J., Lopes, A., Gazim, Z., do Valle, J., Colauto, N., y Linde, G. (2022). Endophytic fungi of *Brunfelsia uniflora*: isolation, cryopreservation, and determination of enzymatic and antioxidant activity. In World Journal of Microbiology and Biotechnology (Vol. 38, Issue 6). <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03278-5>
- Martínez, R., y Pérez, L. (2020). Reducción de oxidación en explantes fenolados: estrategias y resultados. Journal of Plant Micropropagation, 10(4), 78-86.
- Mata, J., Rocha, A., Salcedo, S., Cruz, P., y Ortega, M. (2023). Desinfección de folíolos de nogal pecanero adulto, e inducción de callogénesis *in vitro*. Polibotanica, 55, 121–144. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.55.9>
- Melo, O., López, L., y Melo, S. (2020). Diseño de experimentos: métodos y aplicaciones. In Diseño de experimentos: métodos y aplicaciones. <https://doi.org/10.36385/fcbog-4-0>
- Mongelós, Y., Mussi, C., Duarte, N., y Díaz, M. (2020). Protocolo de desinfección para establecimiento *in vitro* de meristema apical de banano *Musa spp.* CEDAMAZ, 10(2), 47–50. Recuperado de: <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/cedamaz/article/view/815>
- Morrow, J. (2016). *Myrcianthes* *rhopaloides*. http://www.phytoimages.siu.edu/imgs/paraman1/r/Myrtaceae_Myrcianthes%20rhopaloides_115805.html

- Palomino, J., Esquivel, R., Huamancusi, J., Alarcón, S., y Blásquez, C. (2022). *Azospirillum brasilense* y ácido indol-3-butírico en el enraizamiento de tallos de palto (*Persea americana* Mill.). *Bioagro*, 35(1). <https://doi.org/10.51372/bioagro351.8>
- Pérez, J., Martínez, M., y Hernández, F. (2020). Biotechnology of inoculation of trees of forest importance with edible ectomycorrhizal fungi. *Agroproductividad*, 13(5), 91–92.
- Phillips, GC y Garda, M. (2019). Medios y prácticas de cultivo de tejidos vegetales: una descripción general. *Biología celular y del desarrollo in vitro - Plantas*, 55 (3), 242 <https://doi.org/10.1007/s11627>
- Pinto, G. (2020). Asignación de biomasa y distribución radicular del híbrido interespecífico de palma aceitera (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*)
- Plantigen Himedia. (2017). Woody Plant Medium. www.himedialabs.com
- Polo, J., Suarez, I., y Gatti, K. (2013). Micropropagación de *Tectona grandis* L. f. a partir de meristemos preexistentes, 18(2)
- Proença, C., y Lucas, E. (2023). *Myrcianthes* (Myrtaceae) revisited: a new species, a new synonym, a lectotypification and an overview of its wood anatomy. *Kew Bulletin*, 78(2), 171–174. <https://doi.org/10.1007/s12225-023-10079-y>
- Rodríguez, L. (2006). Contribución a la propagación de *Myrcianthes rhopaloides* (H.B.K) McVaugh “Lanche” en el caserío de Carpinteros Chalaco-Morropón. Piura.
- Rojas, R., Ramírez, F., Companioni, B., Vera, I., Robledo, V., y García, H. (2021). Desarrollo de un método eficiente para la micropropagación de orégano. <https://doi.org/https://doi.org/10.29312/remexca.v0i26.2944>
- Ruiz, S., Gómez, P., y Castro, D. (2019). Protocolos avanzados de desinfección en la micropropagación vegetal. *Planta y Ciencia*, 12(1), 25-32.
- Salazar, K. (2020). Establecimiento de un protocolo de propagación *in vitro* a partir de dos explantes de *Solanum betaceum*. Tesis, 1–100.
- Sánchez, L., y Alvarenga, S. (2014). Callogénesis y establecimiento del cultivo de células en suspensión de *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. (uña de gato).
- Sharry, S., Adema, M., y Abedini, W. (2020). Plantas de probeta Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. Plantas de Probeta.

- Sifuentes, D. (2021). Propagación vegetativa del cedro (*Cedrela odorata* L.) mediante el enraizamiento de mini estacas juveniles en cámaras de sub irrigación, en Jenaro herrera (loreto) amazonia peruana. Repositorio Universidad Nacional Agraria De La Molina.
- Silva, D., Matulevich, J., y Devia, B. (2016). Composición química del aceite esencial de hojas de *Myrcianthes rhopaloides* (Kunt) McVaugh (Myrtaceae). Revista Facultad de Ciencias Básicas, 12(1). <https://doi.org/10.18359/rfcb.1857>
- Tejada, J., Oliva, M., Collazos, R., Vilca, N., y Huaman, E. (2019). Efecto del ácido indolbutírico (AIB) sobre el enraizamiento y adaptabilidad de segmentos nodales de arándano (*Vaccinium corimbosum* L.). Revista de Investigación de Agroproducción Sustentable, 3(3). <https://doi.org/10.25127/aps.20193.498>
- Torres, J., León, J., y Tomas, G. (2017). Actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán” frente a patógenos de origen clínico. In Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología (Vol. 37).
- Uvidia, K., Salazar, L., y Bonilla, S. (2022). Caracterización de fragmentos de bosque montano en un escenario de transición urbana. CienciAmérica, 11(2). <https://doi.org/10.33210/ca.v11i2.396>
- Valle, R. (2021). Efecto de los reguladores de crecimiento en la multiplicación *in vitro* de plátano (*Musa × paradisiaca* L.): Revisión de Literatura. In Biblioteca Wilson Popenoe: (Vol. 1)
- Vistín, D., y Espinoza, D. (2021). Estructura y Diversidad de Especies Arbóreas del Bosque Siempreverde Montano Alto del Parque Nacional Sangay-Ecuador. Ciencias Técnicas y Aplicadas, 7

ANEXOS

Anexo 1. Localización lugar de muestreo.



Anexo 2. Transporte de muestras vegetales



Anexo 3. Solicitud Ministerio del Ambiente, Agua y Transición ecológica.

0239

15-01-25

Ambato, 15 de enero de 2024

Ingeniero

Pablo Pazmiño Freire

RESPONSABLE DE A OFICINA TÉCNICA DE AMBATO

MINISTERIO DEL AMBIENTE, AGUA Y TRANSICIÓN ECOLÓGICA

Presente.-

De mi consideración:

Evelyn Monserrath Rivadeneira Salazar, con cédula de ciudadanía No. 1805201157, estudiante de la Universidad Técnica de Ambato de la carrera de Biotecnología solicito comedidamente se nos emita un documento en el cual conste que no requiero ningún permiso especial para la realización de mi proyecto de titulación **"EVALUACIÓN DE LA INCIDENCIA DE WOODY PLANT MEDIUM Y ÁCIDO INDOL-3-BUTÍRICO SOBRE EL ENRAIZAMIENTO *IN VITRO* DE EXPLANTES DE *Myrcianthes rhopaloides*".** Este proyecto será realizado únicamente con fines investigativos.

Por la favorable atención que se de al presente, muchas gracias.

Atentamente



Evelyn Monserrath Rivadeneira Salazar

1805201157

0995159004

Erivadeneira1157@uta.edu.ec

MINISTERIO DEL
AMBIENTE Y AGUA
DIRECCIÓN ZONAL CHIMBORAZO
RECIBIDO
OFICINA TÉCNICA AMBATO
Hora: 14:52
Fecha: 15-01-25
Firma: [Signature]

Anexo 4. Carta compromiso para recolección de muestras vegetales hoja 1.

Carta de Compromiso para la Recolección de Muestras Vegetales

Dirigida a: Sr. Patricio Mayorga

Lugar: Ambato

Fecha: 15 de octubre de 2024

Estimado Sr. Mayorga:

Por medio de la presente, me permito formalizar mi compromiso con usted en relación a la recolección de muestras vegetales de *M. rhopaloides* (explantes internodales y apicales) en su propiedad, ubicada en la Parroquia de San Bartolomé de Pinllo. Agradezco profundamente su disposición para colaborar con esta investigación científica, la cual busca evaluar la incidencia de Woody Plant Medium y ácido indol-3-butírico sobre el enraizamiento *in vitro* de explantes de *M. rhopaloides*. Articulado al Proyecto de Prácticas de Servicio Comunitario aprobado mediante Resolución Nro. UTA-CONVISO-2024-009.

Me comprometo a cumplir con los siguientes puntos durante la realización de las actividades de muestreo:

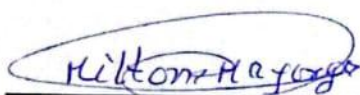
1. **Recolección Responsable:** Las muestras serán recolectadas de manera cuidadosa y en cantidades mínimas necesarias, con el fin de evitar cualquier daño o alteración significativa al crecimiento y desarrollo de los especímenes.
2. **Respeto a la Propiedad:** Se garantizará el respeto total a su propiedad, minimizando cualquier perturbación en el entorno durante la recolección de las muestras.
3. **Uso Exclusivo para Investigación:** Las muestras recolectadas serán utilizadas exclusivamente para fines de investigación científica y no serán comercializadas ni destinadas a otros propósitos.
4. **Información y Transparencia:** Se le mantendrá informado sobre los avances del estudio y los resultados obtenidos, asegurándole el acceso a la información pertinente.
5. **Cumplimiento de Normativas:** Todas las actividades se realizarán en estricto cumplimiento de las normativas legales y éticas aplicables a la recolección de muestras vegetales y protección ambiental.

Anexo 5. Carta compromiso para recolección de muestras vegetales hoja 2.

Reconozco y acepto la responsabilidad de garantizar que la colaboración se lleve a cabo de manera respetuosa y beneficiosa para ambas partes.

Agradezco nuevamente su valiosa colaboración y quedo a su disposición para cualquier consulta o inquietud que pudiera surgir.

Atentamente,



Sr. Milton Patricio Mayorga

López

1801187806



Dra. Helena Maritza de la

Torre Olvera

1309651998



Evelyn Monserrath

Rivadeneira Salazar

1805201157

Anexo 6. Código Spyder 6

Importar librerías necesarias

```
import pandas as pd
```

```
from scipy.stats import shapiro, f_oneway, ttest_ind
```

```
import matplotlib.pyplot as plt
```

```
# -----
```

Paso 1: Cargar los datos

```
# -----
```

```
data = {
```

```
    "Concentración": [0.15, 0.15, 0.15, 0.2, 0.15, 0.2, 0.15, 0.2, 0.15, 0.2, 0.15, 0.2, 0.15, 0.2, 0.15, 0.2, 0.15, 0.2],
```

```
    "Explante": [
```

```
        "0WA", "0WI", "1WA", "1WI", "2WA", "2WA", "2WI", "2WI",
```

```
        "3WA", "3WI", "4WA", "4WI", "4WI", "5WA", "5WA", "5WI",
```

```
        "5WI", "3WA", "3WI", "0WA"
```

```
    ],
```

```
    "Semana_3": [0.09, 0.1, 0.05, 0.1, 0.09, 0.11, 0.11, 0.09, 0.05, 0.09, 0.08, 0.11, 0.09, 0.1, 0.05, 0.09, 0.09, 0.05, 0.09, 0.09],
```

```
    "Semana_4": [0.1, 0.12, 0.06, 0.11, 0.1, 0.12, 0.12, 0.1, 0.06, 0.1, 0.09, 0.12, 0.1, 0.11, 0.06, 0.09, 0.09, 0.06, 0.1, 0.1],
```

```
    "Semana_5": [0.13, 0.13, 0.07, 0.12, 0.11, 0.13, 0.13, 0.11, 0.07, 0.12, 0.13, 0.13, 0.12, 0.13, 0.07, 0.09, 0.09, 0.07, 0.12, 0.13],
```

```
    "Semana_6": [0.14, 0.14, 0.08, 0.13, 0.12, 0.14, 0.14, 0.12, 0.08, 0.14, 0.13, 0.13, 0.13, 0.13, 0.07, 0.13, 0.13, 0.08, 0.14, 0.14],
```

```
}
```

Crear DataFrame

```
df = pd.DataFrame(data)
```

```
# -----
```

Paso 2: Transformar los datos

```
# -----
```

```
df_melted = df.melt(id_vars=["Concentración", "Explante"],
```

```

        value_vars=["Semana_3", "Semana_4", "Semana_5", "Semana_6"],
        var_name="Semana", value_name="Longitud")

# -----

# Paso 3: Prueba de normalidad

# -----

stat, p_value = shapiro(df_melted["Longitud"])
print("\nPrueba de Shapiro-Wilk:")
print(f"Estadístico: {stat}, p-value: {p_value}")

if p_value > 0.05:

    print("Los datos siguen una distribución normal.")
else:

    print("Los datos no siguen una distribución normal.")

# -----

# Paso 4: ANOVA

# -----

longitudes_15 = df[df["Concentración"] == 0.15][["Semana_3", "Semana_4", "Semana_5",
"Semana_6"]].values.flatten()

longitudes_2 = df[df["Concentración"] == 0.2][["Semana_3", "Semana_4", "Semana_5",
"Semana_6"]].values.flatten()

anova_stat, anova_p = f_oneway(longitudes_15, longitudes_2)

print("\nResultados del ANOVA:")
print(f"Estadístico: {anova_stat}, p-value: {anova_p}")

if anova_p < 0.05:

    print("Existen diferencias significativas entre las medias.")
else:

    print("No existen diferencias significativas entre las medias.")

# -----

# Paso 5: Comparaciones múltiples (Bonferroni)

# -----

grupos = df_melted.groupby("Concentración")["Longitud"].apply(list)

```

```

comparaciones = []
for i, grupo1 in enumerate(grupos):
    for j, grupo2 in enumerate(grupos):
        if i < j:
            t_stat, t_p = ttest_ind(grupo1, grupo2)
            # Ajuste Bonferroni
            t_p_adjusted = t_p * len(grupos)
            comparaciones.append((f"Grupo {i+1} vs Grupo {j+1}", t_stat, t_p_adjusted))
print("\nComparaciones múltiples (corrección Bonferroni):")
for comp in comparaciones:
    print(f"{comp[0]} -> Estadístico: {comp[1]}, p-value ajustado: {comp[2]}")
# -----

# Paso 6: Gráficos comparativos
# -----

semanas = [3, 4, 5, 6]

# Promedios de longitudes por concentración

tiempos = ["Semana_3", "Semana_4", "Semana_5", "Semana_6"]
promedios_15 = df[df["Concentración"] == 0.15][tiempos].mean()
promedios_2 = df[df["Concentración"] == 0.2][tiempos].mean()

plt.figure(figsize=(10, 6))

plt.plot(semanas, promedios_15, marker='o', label="0.15 mg/mL", color='blue')
plt.plot(semanas, promedios_2, marker='o', label="0.2 mg/mL", color='red')

plt.title("Comparación de longitudes por concentración de AIB", fontsize=14)
plt.xlabel("Semana", fontsize=12)
plt.ylabel("Longitud promedio (mm)", fontsize=12)
plt.legend()
plt.grid()
plt.tight_layout()
plt.show()

```

Promedios por tipo de explante

```
longitudes_WA = [0.072, 0.086, 0.099, 0.108] # Explantes WA
longitudes_WI = [0.098, 0.114, 0.120, 0.126] # Explantes WI
plt.figure(figsize=(10, 6))
plt.plot(semanas, longitudes_WA, marker='s', label='Explantes WA', color='green')
plt.plot(semanas, longitudes_WI, marker='s', label='Explantes WI', color='orange')
plt.title("Comparación de longitudes por tipo de explante", fontsize=14)
plt.xlabel("Semana", fontsize=12)
plt.ylabel("Longitud promedio (mm)", fontsize=12)
plt.xticks(semanas)
plt.legend(fontsize=10)
plt.grid(True)
plt.tight_layout()
plt.show()
```

Evolución temporal combinada

```
longitudes_combinadas = {
    "0.15 WA": [0.070, 0.084, 0.096, 0.106],
    "0.15 WI": [0.100, 0.110, 0.118, 0.123],
    "0.2 WA": [0.075, 0.088, 0.101, 0.109],
    "0.2 WI": [0.115, 0.118, 0.123, 0.129],
}
plt.figure(figsize=(12, 8))
for label, data in longitudes_combinadas.items():
    plt.plot(semanas, data, marker='^', label=label)
plt.title("Evolución temporal por concentración y tipo de explante", fontsize=14)
plt.xlabel("Semana", fontsize=12)
plt.ylabel("Longitud promedio (mm)", fontsize=12)
plt.xticks(semanas)
plt.legend(fontsize=10)
```

```
plt.grid(True)
plt.tight_layout()
plt.show()
```