

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE INGENIERÍA AGRÓNOMICA



PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

“Establecimiento *in vitro* de plantas de arándanos variedad Biloxi
(*Vaccinium corymbosum* L.) en el medio WPM”

DOCUMENTO FINAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN COMO
REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE INGENIERA
AGRÓNOMA

AUTORA.

MARCIA VIVIANA TOAPANTA CAIZA

TUTOR.

Ing. Michel Leiva Mora Dr.C.

AMBATO – ECUADOR

2021-2022

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“La suscrita, TOAPANTA CAIZA MARCIA VIVIANA, portador (a) de cédula de identidad número. 1850107705, libre y voluntariamente declaro que el informe final del Proyecto de investigación titulado. “Establecimiento *in vitro* de plantas de arándano variedad Biloxi (*Vaccinium corymbosum* L.) en el medio WPM” es original, auténtico y personal. En la virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepción donde se indican las fuentes de información consultadas”



Marcia Viviana Toapanta Caiza

DERECHOS DE AUTOR

“Al presentar este informe final del Proyecto de Investigación titulado “ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE PLANTAS DE ARÁNDANOS VARIEDAD BILOXI (*Vaccinium corymbosum* L.) EN EL MEDIO WPM”, como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Ingeniera Agrónoma, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice copia de este informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este informe final, o parte de él”.



Marcia Viviana Toapanta Caiza

**“ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE PLANTAS DE ARÁNDANOS VARIEDAD
BILOXI (*Vaccinium corymbosum* L.) EN EL MEDIO WPM”.**

REVISADO POR.



Firmado electrónicamente por:
MICHEL LEIVA MORA

.....
Ing. Michel Leiva Mora Dr.C.

TUTOR

APROBADO POR LOS MIEMBROS DE CALIFICACIÓN

FECHA



Firmado electrónicamente por:
**MANOLO SEBASTIAN
MUNOZ ESPINOZA**

27/06/2022

.....
Ing. Mg. Manolo Muñoz, PhD.

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN



Firmado electrónicamente por:
**SEGUNDO
EUCLIDES CURAY
QUISPE**

19/07/2022

.....
Ing. Mg. Marco Pérez, PhD.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN



Firmado electrónicamente por:
**MARCO OSWALDO
PEREZ SALINAS**

22/07/2022

.....
Ing. Mg. Segundo Curay, PhD.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

DEDICATORIA

Primeramente, a Dios por ser mi fuerza para seguir adelante por brindarme salud, vida y tener la dicha de cumplir con cada una de mis metas planteadas, a mis padres Miguel y Eufemia por ser mi pilar fundamental y mi ejemplo a seguir con su apoyo en cada uno de mis sueños cumplidos, por siempre estar a mi lado a pesar de cada una de las dificultades que se me ha presentado en todo el transcurso de mi vida, a ustedes padres les dedico este logro además por su paciencia, el amor y la comprensión en cada uno de los pasos que he dado. A ti papá con tus consejos y el amor brindado desde pequeña me ha motivado a seguir adelante y esforzarme cada día más para cumplir con mis objetivos y nunca por darme por vencida y como no dedicarle esta meta cumplida a mi mamá que me motivaban con sus palabras de amor y cariño ayudándome para poder culminar con este proceso.

A mis hermanas Martha y Nancy que con su apoyo, cariño y consejos estuvieron siempre allí apoyándome en cada uno de mis logros por ser la menor ustedes fueron mi motivación para seguir adelante.

A mi hija Alexandra que a pesar de haberme alejado desde muy pequeña de ti para terminar con mis estudios con tu amor y cariño que me demuestras al llegar a casa y recibir un abrazo me motiva a seguir adelante a ti mi pequeña te dedico este logro.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios y a la Virgen Santa Lucia por darme la dicha de tener a toda mi familia con salud además de brindarme una nueva oportunidad de vida y poder culminar con mis estudios.

A la Universidad Técnica de Ambato en especial a la Facultad de Ciencias Agropecuarias, por brindarme la oportunidad de estudiar y formarme en mi carrera universitaria, por cada una de las enseñanzas y momentos compartidos para lograr cumplir con mi sueño de obtener el título de tercer nivel como Ingeniera Agrónoma.

A mi tutor de tesis el Doctor Michel Leiva Mora. quien me brindó su apoyo y fue mi guía durante todo el proceso de la realización de este proyecto de investigación de igual manera al Ing. Segundo Curay, Ing. Marco Pérez y al Ing. Juan Yáñez por sus recomendaciones y consejos en la elaboración de este proyecto.

A mis compañeras de la Universidad especialmente a Adela † y Andrea que a lo largo de mi carrera universitaria he compartido momentos muy agradables junto a ellas.

“No hay personas cosas imposibles solo personas incapaces”

¡A todos muchas gracias!

MARCIA VIVIANA TOAPANTA CAIZA

ÍNDICE

CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Introducción.....	1
1.2. Antecedentes investigativos	3
1.3. Categorías fundamentales o marco conceptual	6
1.3.1. Generalidades.....	6
1.3.2. Situación del cultivo en el Ecuador	7
1.3.3. Composición nutricional.....	9
1.3.4. Clasificación taxonómica.....	10
1.3.5. Características botánicas.....	10
1.3.6. Requerimientos edafo-climáticos	11
1.3.7. Plagas y enfermedades.....	13
1.3.8. Medio de cultivo y hormonas	16
1.3.9. Métodos de propagación.....	20
1.3.10. Etapas del cultivo <i>in vitro</i>	21
1.4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	23
1.4.1. Hipótesis	23
1.4.2. Objetivos.....	24
CAPÍTULO II	25
METODOLOGÍA	25
2.1. Ubicación del experimento.....	25
2.2. Características del lugar	25

2.3. Equipos y materiales.....	25
2.3.1. Material experimental.....	25
2.3.2. Equipos.....	26
2.3.3. Materiales.....	26
2.4. Factores de estudio.....	28
2.4.1. Objetivo 1. Establecer segmentos nodales en el medio de cultivo WPM.	28
2.4.2. Objetivo 2. Determinar la influencia de los reguladores de crecimiento y factores del ecosistema <i>in vitro</i> en el establecimiento de segmentos nodales.	28
2.4.3. Objetivo 3. Conformar un banco de plantas donantes de (<i>V. corymbosum</i>) con características juveniles <i>in vitro</i>	29
2.5. Diseño experimental.....	29
2.6. Manejo del experimento.....	29
2.6.1. Gráfico 1. Determinación de la influencia de los reguladores de crecimiento en el establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales de arándanos (<i>V. corymbosum</i>) variedad Biloxi.	30
2.6.2. Gráfico 2. Determinación de la influencia del tipo de antioxidante y luminosidad <i>in vitro</i> en el establecimiento de segmentos nodales de arándano Var. Biloxi.	32
2.6.3. Gráfico 3. Determinación del tipo de agente gelificante y la influencia del tipo de frasco de arándanos (<i>V.corymbosum</i>) con características juveniles <i>in vitro</i>	32
2.6.4. Gráfico 4. Establecimiento de segmentos nodales en el medio de cultivo WPM.	34
2.7. Tratamientos.....	37
2.7.1. Objetivo 1. Establecer segmentos nodales en el medio de cultivo WPM.	37
2.7.2. Objetivo 2. Determinar la influencia de los reguladores de crecimiento y factores del ecosistema <i>in vitro</i> en el establecimiento de segmentos nodales.	37

2.7.3. Objetivo 3. Conformar un banco de plantas donantes de (<i>V. corymbosum</i>) con características juveniles <i>in vitro</i>	41
2.8. Variables respuesta.....	42
2.9. Procesamiento de la información	43
CAPÍTULO III.....	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
3.1. Establecimiento de segmentos nodales de arándano en el medio de cultivo WPM.	44
3.1.1. Influencia de la consistencia del medio de cultivo en el establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales de arándanos (<i>V. corymbosum</i>) variedad Biloxi.....	44
3.1.2. Influencia de la procedencia del explante en el establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales de arándanos (<i>V. corymbosum</i>) variedad Biloxi.....	46
3.1.3. Influencia de la frecuencia de subcultivo en el establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales de arándanos (<i>V. corymbosum</i>) variedad Biloxi.....	48
3.2. Determinación de la influencia de los reguladores de crecimiento y factores del ecosistema <i>in vitro</i> en el establecimiento de segmentos nodales.	50
3.2.1. Influencia del tipo de auxinas y sus concentraciones en el establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales de arándanos (<i>V. corymbosum</i>) variedad Biloxi.....	50
3.2.2. Influencia del tipo de citoquininas y sus concentraciones en el establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales de arándanos (<i>V. corymbosum</i>) variedad Biloxi.	56
3.2.3. Influencia de condiciones de luminosidad en el establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales de arándanos (<i>V. corymbosum</i>) variedad Biloxi.....	60
3.2.4. Influencia del antioxidante en el establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales de arándanos (<i>V. corymbosum</i>) variedad Biloxi.....	62
3.3. Conformar un banco de plantas donantes con características juveniles.....	64
3.3.2. Influencia del tipo de frasco en el establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales de arándanos (<i>V. corymbosum</i>) variedad Biloxi.....	64

3.3.3. Influencia del agente gelificante sobre las características juveniles de las plantas de arándanos (<i>V. corymbosum</i>) variedad Biloxi.....	67
CAPITULO IV	70
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	70
4.1. CONCLUSIONES.....	70
4.2. RECOMENDACIONES	71
BIBLIOGRAFÍA.....	72
ANEXOS.....	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición nutricional por cada 100 g de arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.).....	9
Tabla 2. Clasificación taxonómica del arándano (<i>V. corymbosum</i>)......	10
Tabla 3. Composición del medio de cultivo Murashige y Skoog.	16
Tabla 4. Composición I medio de cultivo Woody Plant Medium.....	17
Tabla 5. Concentración de auxinas ANA (Ácido 1-naftalenacético), AIA (Ácido indol-3-acético) Y AIB (Ácido indol-3-butírico).....	38
Tabla 6. Preparación de auxinas a distintas concentraciones ANA (Ácido 1-naftalenacético), AIA (Ácido indol-3-acético) Y AIB (Ácido indol-3-butírico).....	38
Tabla 7. Concentración de citoquininas 2-iP y THIDIAZURON.....	39
Tabla 8. Preparación de citoquininas a distintas concentraciones 2- iP y THIDIAZURON.	39
Tabla 9. Preparación del agente antioxidante Ácido cítrico, Ácido ascórbico y Cisteína.	40
Tabla 10. Preparación del tipo de agente gelificante MaCconkey Agar, Phytigel y Agar.	41
Tabla 11. Influencia de la consistencia del medio sobre el porcentaje de contaminación y el porcentaje de establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales de plantas de arándanos (<i>V. corymbosum</i>) Var. Biloxi del banco de plantas donantes de la FCAGP-UTA a los 8, 15, 22 y 29 días.	44
Tabla 12. Influencia del tipo de explantes sobre el porcentaje de contaminación y el porcentaje de establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales de plantas de arándanos (<i>V. corymbosum</i>) Var. Biloxi del banco de plantas donantes de la FCAGP-UTA a los 8,15, 22 y 29 días.	46
Tabla 13. Influencia de la frecuencia de subcultivo sobre el porcentaje de contaminación y el porcentaje de establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales de plantas de arándanos	

(<i>V. corymbosum</i>) Var. Biloxi del banco de plantas donantes de la FCAGP-UTA a los 15 y 30 días.	48
Tabla 14. Influencia de diferentes concentraciones de Ácido naftalenacético (ANA) sobre el porcentaje de contaminación y el porcentaje de establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales de plantas de arándanos (<i>V. corymbosum</i>) Var. Biloxi del banco de plantas donante de la FCAGP-UTA a los 8, 15, 22 y 29 días.	50
Tabla 15. Influencia de diferentes concentraciones de Ácido Indol Acético (AIA) sobre el porcentaje de contaminación y el porcentaje de establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales de plantas de arándanos (<i>V. corymbosum</i>) Var. Biloxi del banco de plantas donante de la FCAGP-UTA a los 8, 15, 22 y 29 días.	52
Tabla 16. Influencia de diferentes concentraciones de Ácido Indol butírico (AIB) sobre el porcentaje de contaminación y el porcentaje de establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales de plantas de arándanos (<i>V. corymbosum</i>) Var. Biloxi del banco de plantas donante de la FCAGP-UTA a los 8, 15, 22 y 29 días.	54
Tabla 17. Influencia de diferentes concentraciones de THIDIAZURON (TDZ) sobre el porcentaje de contaminación y el porcentaje de establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales de plantas de arándanos (<i>V. corymbosum</i>) Var. Biloxi del banco de plantas donante de la FCAGP-UTA a los 8, 15, 22 y 29 días.	56
Tabla 18. Influencia de diferentes concentraciones de 2-iP sobre el porcentaje de contaminación y el porcentaje de establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales de plantas de arándanos (<i>V. corymbosum</i>) Var. Biloxi del banco de plantas donante de la FCAGP-UTA a los 8, 15, 22 y 29 días.....	58
Tabla 19. Influencia del tipo de luminosidad sobre el porcentaje de contaminación y el porcentaje de establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales de plantas de arándanos (<i>V. corymbosum</i>) Var. Biloxi del banco de plantas donante de la FCAGP-UTA a los 8, 15, 22 y 29 días.	60
Tabla 20. Influencia del tipo de antioxidante sobre el porcentaje de contaminación y el porcentaje de establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales de plantas de arándanos (<i>V.</i>	

corymbosum) Var. Biloxi del banco de plantas donante de la FCAGP-UTA a los 8, 15, 22 y 29 días.62

Tabla 21. Influencia del tipo de frasco sobre el porcentaje de contaminación y el porcentaje de establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de plantas de arándanos (*V. corymbosum*) Var. Biloxi del banco de plantas donante de la FCAGP-UTA a los 8, 15, 22 y 29 días.65

Tabla 22. Influencia del tipo de agente gelificante sobre el porcentaje de contaminación y el porcentaje de establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de plantas de arándanos (*V. corymbosum*) Var. Biloxi del banco de plantas donante de la FCAGP-UTA a los 8, 15, 22 y 29 días.67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales en diferente consistencia del medio Semisólido (A) y Líquido con puente de papel filtro (B).	45
Figura 2. Establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales con diferentes procedencias de explantes invernadero (A), condiciones controladas UTA (B) y <i>in vitro</i> (C).....	47
Figura 3. Establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales con diferentes frecuencias de subcultivo 15 días (A) y 30 días (B).	49
Figura 4. Establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales con diferentes concentraciones de auxinas ANA 100 ppm (A), 200 ppm (B), 250 ppm (C), 300 ppm (D), 350 ppm (E), Control (F).....	51
Figura 5. Establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales con diferentes concentraciones de auxinas AIA 100 ppm (A), 150 ppm (B), 200 ppm (C), 250 ppm (D), 300 ppm (E), Control (F).....	53
Figura 6. Establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales con diferentes concentraciones de auxinas AIB 300 ppm (A), 400 ppm (B), 500 ppm (C), 600 ppm (D), 700 ppm (E), Control (F).....	55
Figura 7. Establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales con diferentes concentraciones de citoquininas Thidiazuron 0,01ppm (A), 0,05 ppm (B), 0,1 ppm (C), 1,0 ppm (D), 1,5 ppm (E).....	57
Figura 8. Establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales en diferentes concentraciones de citoquininas 2AiP 2ppm (A), 3 ppm (B), 4 ppm (C), 5 ppm (D), 6 ppm (E).....	59
Figura 9. Establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales con diferentes condiciones de iluminación oscuridad (A), luz blanca fluorescente (B), luz natural (C), fotoperíodo 1 (24 h luz blanca fluorescente /24 h oscuridad) y fotoperíodo 2 (24 h luz natural /24 h oscuridad).....	61
Figura 10. Establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales con diferentes tipos de antioxidantes ácido cítrico 0,05 g (A), cisteína 0,05 g (B), ácido ascórbico 0,05 g (C). .	63

Figura 11. Establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales en diferentes tipos de envases frascos de vidrio (A), frascos de plástico (B) y tubos de ensayo de vidrio (C).	65
Figura 12. Establecimiento <i>in vitro</i> de segmentos nodales con diferentes tipos de agentes gelificantes Agar (A), Phytigel (B) y Makonkey agar (C).	68

RESUMEN

La presente investigación se desarrolló con la finalidad de determinar cómo influyen varios factores en el establecimiento y contaminación *in vitro* de arándanos variedad Biloxi entre los cuales se pueden mencionar consistencia del medio, procedencia del explante, frecuencia de subcultivo, tipo y concentración de auxinas y citoquininas, condiciones de luminosidad, tipo de antioxidante, tipo de frasco y agente gelificante. Se empleó un diseño completamente al azar. Para la evaluación de los diferentes tratamientos se utilizó el medio de cultivo WPM, explantes del banco de plantas de la FCAGP de la UTA y de invernadero fueron los que mayor porcentaje de supervivencia presentaron durante los 29 días de evaluación. En cuanto al ensayo realizado con el tipo y la concentración de auxinas como AIA, AIB Y ANA se determinó que no existieron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos evaluados en cuanto a la variable de porcentaje de establecimiento y contaminación. En el caso del ensayo con citoquininas el mejor resultado con THIDIAZURON presento a una concentración de 0,05 ppm y 2-Ip con una concentración de 3 ppm el tamaño de sus brotes fue superior a los demás tratamientos evaluados. Las condiciones de luminosidad que mejores resultados presentaron fueron luz blanca fluorescente y fotoperiodo 1 (24 h luz blanca fluorescente/ 24 h oscuridad). La utilización de antioxidantes como el ácido cítrico y cisteína a 0,05gr presentaron mayor crecimiento de brotes caso contrario lo que sucedió cuando se utilizó ácido ascórbico los brotes presentaron necrosamiento a los 22 días de su establecimiento. Finalmente, los factores consistencia del medio, frecuencia de subcultivo y tipo de frasco no presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos evaluados tanto en la variable porcentaje de establecimiento y contaminación en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales.

Palabras clave: Brotes, Contaminación, Establecimiento, *In vitro*, Micropropagación.

ABSTRACT

The present investigation was developed with the purpose of determining how several factors influence the establishment and contamination in vitro of blueberries Biloxi variety, among which we can mention consistency of the medium, origin of the explant, frequency of subculture, type and concentration of auxins and cytokinins, light conditions, type of antioxidant, type of flask and gelling agent. A completely randomized design was used. For the evaluation of the different treatments, the WPM culture medium was used, explants from the plant bank of the FCAGP of the UTA and from the greenhouse were those that presented the highest percentage of survival during the 29 days of evaluation. Regarding the trial carried out with the type and concentration of auxins such as AIA, AIB and ANA, it was determined that there were no significant statistical differences between the treatments evaluated in terms of the variable of percentage of establishment and contamination. In the case of the trial with cytokinins, the best result with THIDIAZURON presented at a concentration of 0.05 ppm and 2-iP with a concentration of 3 ppm, the size of the shoots was superior to the other treatments evaluated. The light conditions that showed the best results were fluorescent white light and photoperiod 1 (24 h fluorescent white light/ 24 h darkness). The use of antioxidants such as citric acid and cysteine at 0.05 g showed greater shoot growth, which was the opposite of what happened when ascorbic acid was used, the shoots showed necrosis 22 days after establishment. Finally, the factors consistency of the medium, frequency of subculture and type of flask did not show significant statistical differences between the treatments evaluated in the percentage of establishment and contamination in the in vitro establishment of nodal segments.

Key words: Sprouting, Contamination, Establishment, *In vitro*, Micropropagation.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Introducción

El arándano también conocido como bayas o frutas del bosque por su color y tamaño distintivo y pequeño crecen como arbustos silvestres. En la antigüedad no se cultivaban. El color característico de esta fruta se debe a los pigmentos de antocianina sintetizados por la planta; de acuerdo con varias investigaciones se ha demostrado que contiene altos niveles de polifenoles (flavonoide, antocianina, tanino, etc.) localizados en su mayoría en la piel y las semillas (**Brenes et al., 2015**).

Litwińczuk. 2013 mencionó que el arándano es un arbusto pequeño perenne, se encuentra dentro de la familia Ericáceas y pertenece al género *Vaccinium*. Este cultivo es nuevo se introdujo en el año 1950 siendo un híbrido de 3 especies (*V. australe*, *V. corymbosum* y *V. angustifolium*); a diferencia de otras especies frutales. Su comercialización es limitada, siendo la más apetecida el arándano rojo y arándano azul, Chile en el año 2015 exportó 12,951 toneladas mientras que en el año 2021 llegó a exportar 162,456 toneladas a diferencia de Ecuador que ha cultivado 50 hectáreas hasta el año 2021 exportando 107,229 toneladas (**Meléndez et al., 2021**).

Los países que se dedican a la exportación de arándano son Chile, Perú y Argentina. La demanda de este producto es alta, el mercado global se enfoca en abastecer durante todo el año (**Salgado et al., 2018**). La creciente demanda comercial es el principal motor para su producción, esta fruta es usada como consumo fresco, zumos, confituras, incluso en el área farmacéutica por su alto contenido de antioxidantes. Se considera un alimento funcional y dietético por sus propiedades fitoquímicos, funcionales y restaurador (**Nin et al., 2021**).

Existen diversos cultivares para diferentes zonas de producción, teniendo en cuenta la calidad y pureza varietal de la semilla la cual debe estar libre de plagas y enfermedades. Una forma de propagación comercial es la vegetativa mediante el enraizamiento de estacas. Sin embargo, algunos genotipos muestran porcentajes bajos de enraizamiento **(Brenes et al., 2015)**. El cultivo *in vitro* se ha convertido en el método de propagación masiva del material de siembra. Su principal ventaja se basa en utilizar un número mínimo de material vegetal para obtener la producción masiva de las plantas las cuales se pueden producir durante todo el año con ausencia de plagas y enfermedades y finalmente el espacio para su producción es reducido a diferencia de los sistemas tradicionales **(Jiménez & Abdelnour, 2018)**.

A partir del cultivo *in vitro* de arándano de la variedad Biloxi, se obtiene plantas con un incremento productivo en un menor tiempo, sin ser afectadas por las condiciones climáticas. La variedad Biloxi necesita 400 horas frío, para alcanzar las características físicas, químicas y organolépticas **(Lerma et al., 2019)**. El medio que se utiliza para la micropropagación es Wody Plant Medium (WPM) que ayuda a promover la proliferación y elongación de los brotes. Es el medio de cultivo que se ha recomendado para el arándano por su contenido de sales, nitrato de calcio y fuentes de hierro ayuda a obtener plantas vigorosas **(Hine & Abdelnour, 2013)**.

La finalidad de este proyecto es establecer segmentos nodales en el medio de cultivo WPM para conformar un banco de plantas donantes de arándanos variedad Biloxi *in vitro* para ello se utilizó el medio de cultivo WPM semisólido los resultados de esta investigación serán de gran importancia en el establecimiento y multiplicación *in vitro* de arándano con el fin de obtener un banco de plantas donantes como prerrequisito para introducir material vegetal juvenil de alta calidad fisiológica y sanitaria e incrementar el número de plantas establecidas *in vitro*.

1.2. Antecedentes investigativos

Rodríguez & Morales (2015) en su investigación “Propagación *in vitro* del cultivo de arándano (*Vaccinium corymbosum* L)” mencionaron los múltiples beneficios del consumo de arándano en la salud de las personas y el incremento de su producción en la actualidad; estos autores elaboraron un protocolo de micropropagación evaluando el medio de cultivo WPM, reguladores de crecimiento 2-iP, AIA y NaClO como agente desinfectante, donde se obtuvo mejores resultados a través de la micropropagación en relación a la propagación por estacas afectada por la baja calidad genética.

A su vez **Jiménez & Agramonte (2013)**, evaluaron un protocolo para la propagación *in vitro* de especies forestales, demostraron un incremento significativo en la comercialización de estas plantas para exportación aumentando el área para su producción a nivel mundial. Se aplicó la técnica de micropropagación para obtener un material de siembra con mejores características.

Según lo mencionado por **Rache & Pacheco (2010)**, en la investigación realizada sobre la reproducción *in vitro* de plantas adultas (*Vaccinium meridionale*) consistió en utilizar explantes primarios de ápices, se evaluó tres factores de estudio (fitohormonas, pH y fotoperiodo), se evaluaron: contaminación, número de hojas y altura de brote. El mejor tratamiento fue donde utilizaron la concentración de zeatina (3mg), pH (5), alcanzando una altura (16,20 ml) con horas luz y oscuridad de 8 días; se obtuvieron plantas libres de plagas y enfermedades logrando introducir esta variedad en diferentes zonas mejorando los ingresos económicos.

Una de las técnicas más usadas en la actualidad es la micropropagación *in vitro* que abastece plantas libres de enfermedades, alta tasa de multiplicación, y puede realizarse durante todo el año. Se utilizaron concentraciones de reguladores de crecimiento durante la fase de multiplicación y enraizamiento. La obtención de material vegetal de fresa donde el mejor resultado fue el T1 (material tipo 2) MS + BAP 0.5 mg/l, que favoreció la formación de brotes y raíz, tuvieron una sobrevivencia del 100% a los 31 días de evaluarse, finalmente se aplicaron fuentes nutricionales, extractos de algas y medio de cultivo Murashige Skoog (**Calzada, 2021**).

En la investigación realizada por **Lerma y sus colaboradores (2019)**, en la actualidad existen limitantes para obtener material de propagación libre de enfermedades por lo cual la propagación *in vitro* es una nueva alternativa para conseguir material óptimo de siembra de la variedad Biloxi. Estos autores analizaron el efecto de concentraciones de zeatina sobre explantes de arándano. Con la concentración de zeatina (1 mg/l) se alcanzó un mayor número de brotes, aunque con 2 mg/l se evidenció un mayor crecimiento de los brotes.

Según lo mencionado por **Brenes et al. (2015)**, señalaron que para poder realizar la micropropagación *in vitro* se necesita un explantes y diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento para obtener plantas con mejores características, mediante el cultivo de tejidos; demostrando la forma de crecimiento más compacta con mayor brotación lateral y números de yemas florales dando como resultado el aumento de frutos e incrementando su rendimiento.

El arándano es apetecido en el mercado por su alto contenido nutricional y medicinal por lo que se ha establecido un método de propagación *in vitro*, tomando como planta madre la variedad Avanblue, los autores sometieron las estacas a 4 desinfecciones para evaluar y comparar la brotación de yemas. Demostraron que la utilización de brotes tiernos de la

panta madre y la desinfección ayudó a obtener un mayor porcentaje de explantes libres de agentes patógenos. Se adicionó CPPU y 2iP para estimular una mayor brotación y longitud del brote **(Hine & Abdelnour, 2013)**.

La investigación tuvo como finalidad evaluar el efecto de las citoquininas en la micropropagación *in vitro* en cuatro variedades (Biloxi, Legacy, Star y Bluecrop) con tres citoquininas del tipo isoprenoides (zeatina, trans-zeatina y cis zeatina) sometidas a concentraciones de 0 mg/l, 1 mg/l, 2 mg/l y 4 mg/l respectivamente. Se evaluaron las siguientes variables: número de brotes, número de hojas, ramificaciones y altura. Se obtuvo mejores resultados con la concentración de Zeatina (2 mg/l), mayor número de brotes y altura **(Ružić et al., 2012)**.

La propagación *in vitro* se obtiene mejor resultados de los ápices de arándanos (*Vaccinium angustifolium* Ait). En el estudio realizado se observó la variación al someter a exposiciones cortas al sol, debido a que son órganos sensibles a la luz, se realizaron ensayos donde se expuso 16 horas luz/oscuridad y los ápices mostraron el acortamiento del entrenudo y hojas verdes. El meristemo disminuye su tamaño y cambia su forma **(Barker & Collins, 2011)**.

Según lo mencionado por **Ramos (2012)**, en su estudio sobre el avance de la micropropagación con la finalidad de obtener la supervivencia de plantas leñosas maderables y frutales, mediante propagación *in vitro*, se basó en aplicar protocolos de asepsia en diferentes fases (establecimiento, multiplicación, enraizamiento y aclimatización) para obtener plantas libres de patógenos y con ello ayudar a la producción de material vegetal de óptimas condiciones.

La alta demanda del arándano (*V. corymbosum* L.) ha influido al uso de técnica biotecnológicas como la micropropagación *in vitro*, en la investigación se evaluó el efecto 2-isoPentil adenina (2iP) y 6-Bencil aminopurina (6-BAP), para el medio de cultivo se utilizó Lloyd y McCown con 30g/L de sacarosa, pH 5.5 y 8 g/L de Agar dando como resultado una contaminación mínima del 25%, siendo el mejor tratamiento es sin regulador de crecimiento para poder establecer *in vitro* micro estacas de a variedad Biloxi (Samir, 2008).

1.3. Categorías fundamentales o marco conceptual

1.3.1. Generalidades

El arándano como género forma parte de cerca de cuatrocientas especies las cuales son conocidas como *Vaccinium* que por lo general se desarrollan en espacios fríos y silvestres, formando parte así de la familia de las Ericaceas aquellos que son originarios del hemisferio norte, es por eso que Norteamérica es considerada en el mundo como uno de los mayores proveedores y consumidores de este fruto, razón por la cual por muchos años esta especie poseía una gran demanda, influenciada por las elevadas tendencias de consumo gracias a los beneficios que presenta para la salud humana (Meléndez et al., 2021).

Dentro del género *Vaccinium* sp., se presentan variedades rastreras con formas de arbustos que dependiendo de la especie su altura varía de 0,3 a una máxima de 0,7 m, estas llegan incluso a tener una vida útil mayor a los cincuenta años por lo que son consideradas especies longevas, sus hojas son alternas, perennes o incluso caducas además poseen raíces finas y vigorosas (Núñez et al., 2008).

El fruto de arándano una vez que se encuentra estructurado adquiere una forma redondeada con una tonalidad verdosa, su sépalo es sobresaliente que en el racimo presentan diversos tamaños, la baya iniciará con una coloración verdosa o incluso una tonalidad verde crema para luego dar paso a una coloración morado claro que indica el inicio de su madurez, una vez que este estado se ha completado la baya adquirirá finalmente una coloración azul a azul oscura la cual se extenderá hasta la decadencia de la producción **(Baldo et al., 2017)**.

1.3.2. Situación del cultivo en el Ecuador

La introducción de este cultivo en Ecuador se logró en el año 2015 por parte del Sr. Patricio Ñacato el cual consiguió su importación desde los Estados Unidos de Norteamérica (Meléndez-Jácome et al., 2021), pero desde aquel instante existió un desconocimiento acerca de cómo realizar los manejos adecuados que necesita este cultivo, debido a que existen pocos profesionales que conozcan y desarrollen el cultivo, de forma específica tanto en los temas agrícolas como en agronegocios, consecuente a esto no existen personas que capaciten a los agricultores y logren explotar este cultivo en el país que de cierta forma se presenta como un negocio muy rentable **(Salgado et al., 2018)**.

Uno de los principales inconvenientes que se presentan en la producción de este fruto en el país es su elevado costo adquisitivo dentro de la región, lo cual se muestra como una limitante dentro de la economía de los agricultores en su intento por explotar este cultivo, dado a que en promedio cada planta llega a ser evaluada en cinco dólares por ende el costo de inversión por hectárea de terreno sería muy costoso ya que se calcula un promedio 6000 pl/ha, a pesar que el rendimiento monetario es elevado y la recuperación de la inversión se estima en un año **(Meléndez et al., 2021)**.

Una de las ventajas que el país posee es su clima, ya que este cultivo por lo general se establece solo en países donde se presentaban las cuatro estaciones, por ende, su producción es limitada, ya que no se obtenían frutos todo el año, por lo que en Ecuador acorde al clima se pueden obtener frutos prácticamente durante todo el año (**Meléndez et al., 2021**).

Una de las principales empresas nacionales que se dedica al cultivo de arándano es la Compañía Biovegetal que desde el año 2015 se dedica a este cultivo en las 3 hectáreas de terreno que cuentan como extensión para su siembra, en el 2017 logró una producción de un estimado de 3 Tm, las cuales se distribuyeron en las grandes cadenas comerciales del Ecuador, que forman parte de la Corporación la favorita, que lleva el nombre de Ecuarandano quien oferta la fruta en recipientes plásticos de 125 g (**González, 2018**).

Tanto la empresa Agrícola Oro Azul como la Compañía Biovegetal implementan en sus terrenos el cultivo de arándano semihidropónico para lo cual suelen utilizar fundas negras y evitan el contacto directo con la tierra, esto les ha permitido tener una mayor densidad de siembra por hectárea logrando además un rendimiento elevado en base a su producción (**González, 2018**).

En Ecuador el cultivo de arándano se desarrolla en la provincia de Pichincha en el valle de Guayllabamba en los cuales se ha utilizado la variedad Biloxi principalmente, la producción es destinada a la cadena Supermaxi que habitualmente requiere de 700 kg mensuales pero el sustento es de solo un máximo de 80 kg (**Meléndez et al., 2021**).

El arándano se ha convertido en un fruto muy cotizado debido a sus propiedades nutritivas entre estas destacan: bajo valor calórico que ostentan además de otros elementos como: calcio (Ca), hierro (Fe), potasio (K), asimismo por su gran contenido de Vitamina C, estos nutrientes favorecen en el equilibrio y mantenimiento de líquidos en el interior y exterior de las células, gracias a su alto contenido de fibra ayuda en el flujo intestinal, provee además de aspectos astringentes debido a su contenido de taninos (**Jiménez & Abdelnour, 2018**)

1.3.3. Composición nutricional

El fruto de arándano es un alimento que posee valores proteicos elevados, ofrece cantidades grandes de vitaminas C, B6 y E, también es rico en otros elementos nutritivos como: Ca, Fe, Mg, P, K, Na y Zn, además contienen otros compuestos esenciales como azúcares, fibra, lípidos y carbohidratos.

Tabla 1. Composición nutricional por cada 100 g de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.).

COMPOSICIÓN NUTRICIONAL			
Energía	60 kcal	Magnesio	5.0 mg
Proteína	0.74 g	Fósforo	10.0 mg
Lípidos	0.33 g	Potasio	79.0 mg
Carbohidratos	14.49 g	Sodio	6,0 mg
Azúcares	9.96 g	Zinc	0.11 mg
Fibra dietética	2.4 g	Vitamina C	9.7 mg
Cenizas	0.21 g	Tiamina	0.05 mg
Agua	84.61 mg	Riboflavina	0.5 mg
Calcio	6.0 mg	Niacina	0.36 mg
Hierro	0.17 mg	Vitamina B6	0.4 mg
Vitamina E 1.0 mg			

Fuente: (Rivadeneira, 2012)

1.3.4. Clasificación taxonómica

El arándano es un cultivo de la especie *Vaccinium corymbosum* L., pertenece al género *Vaccinium* y a la familia *Ericaceae*, se divide a la subfamilia *Vaccinioideae* del orden *Ericales*.

Tabla 2. Clasificación taxonómica del arándano (*V. corymbosum*).

TAXONOMÍA	
Reino	Vegetal
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Ericales</i>
Familia	<i>Ericaceae</i>
Subfamilia	<i>Vaccinioideae</i>
Tribu	<i>Vaccinieae</i>
Género	<i>Vaccinium</i>
Especies	<i>V. corymbosium</i>

Fuente: (Rivadeneira, 2012)

1.3.5. Características botánicas

Raíz: El arándano presenta una raíz superficial, vigorosa y fina que por lo general no poseen pelos absorbentes lo cual limita su capacidad de absorber el agua, si esta planta se encuentra en suelos pesados suelen sufrir los efectos ante un encharcamiento dada su sensibilidad a la falta de oxígeno (**García et al., 2018**).

Hojas: Poseen hojas simples que se forman alternamente en la rama, su forma es lanceolada o incluso ovada y sus tamaños son variados ya que pueden ir de 1 a 8 cm en su largo, su coloración es verde oscuro (**Galarza, 2019**).

Flores: Se ordenan en racimos en cada una de las yemas, son axilares con corolas acampanadas que particularmente presentan una tonalidad blanca, exhiben de 8 a 10 estambres con anteras que pueden o no ser aristadas, son de pistilo simple y ovario ínfero, la cantidad de yemas a desarrollarse en las ramas (2 o más de 20) al parecer se relacionan directamente con el cultivar y el ancho del tallo (**García et al., 2018**).

Frutos: El arándano se presenta con una formación esférica definiéndose como una falsa baya, posee un diámetro de entre 1 a 3 cm, su peso varía entre 0,5 a 4 g y pueden llegar a contener hasta 100 semillas dependiendo de las dimensiones del fruto, su coloración varía en su proceso de formación hasta que toma un color azul al fin de su maduración, el fruto exteriormente se recubre con una capa cerosa (**García et al., 2018**).

1.3.6. Requerimientos edafo-climáticos

Horas frío: Este factor llega a ser muy importante ya que el conocimiento de este nos permitirá saber qué tipo de variedad de arándano se pueden llegar a implementar en ciertas zonas específicas, el periodo de tiempo que las plantas ocupan en su reposo invernal a temperaturas inferiores a los 7°C se lo conoce como horas frío, dada la presencia de diferentes variedades actualmente se pueden implantar este cultivo en sectores con climas claramente diferenciados (**García, 2015**).

Clima: Requiere de grandes cantidades de horas frío invernal puede soportar bajas temperaturas (-30°C) pero no son muy tolerantes a las altas temperaturas principalmente en el verano, aquellas con necesidades de horas frío pueden tolerar temperaturas elevadas que lleguen a superar los 30° sin necesidad de afectar el aspecto del fruto. Los vientos fuertes pueden obstaculizar el crecimiento de la planta, dañando las hojas, reducen la polinización y la floración además que provocan lesiones y caídas de los frutos (**García et al., 2018**).

Suelo: El cultivo de este frutal requiere de un suelo con textura ligera que bien puede ser de tipo franco-arenoso o arenoso, debido a que sus raíces son poco profundas requieren de suelos que retengan humedad pero que también presente buen drenaje, el pH óptimo para este cultivo es de 4,5 a 5,5 lo que permitirá obtener en este cultivo un nivel elevado en su potencial productivo (**García et al., 2018**).

Agua: El arándano es delicado ante la presencia de sequías en especial cuando se encuentra en sus fases más tempranas además de la enorme desventaja de no poseer pelos absorbentes lo que lo vuelve vulnerable a la deshidratación, en las etapas adultas su mayor requerimiento se da cuando se presenta la carga del fruto, el riego por goteo es lo más adecuado para este cultivo, en los periodos del desarrollo del fruto se llegan a requerir de entre 15 a 20 lt/planta por semana, el sistema de riego por aspersión solo es recomendado cuando se presentan riesgos de pérdidas por heladas (**García, 2015**).

1.3.7. Plagas y enfermedades

Plagas

De acuerdo con (Cabezaz-Gutiérrez & Peña-Baracalado, 2011), (Rivadeneira2012), Márquez Janet et al. (2016) y García et al. (2018), investigaciones realizadas describen las principales plagas que atacan al cultivo de arándano.

Trips de las flores (Thysanoptera): Estas por lo general se nutren de las partes florales de las plantas, causando una deficiente polinización, además de interferir en el cuajado del fruto, su ciclo en semanas varia de entre 2 a 3, las hembras se considera que pueden llegar a vivir hasta 45 días.

Cheimatobia (*Cheimatobia brumata* Linnaeus): Esta oruga por lo general busca alimentarse de las yemas que bien pueden ser foliares o florales debido a esto se reduce fuertemente las cosechas, son de coloración verde, se moviliza de forma encorvada usando su abdomen, empiezan alimentándose de las yemas hasta pasar a flores y frutos, ya en su formación de mariposa posee una coloración gris, en el caso de las hembras no llegan a formar alas, pero los machos sí.

Anomala sp.: Estas por lo general se alimentan de las raicillas por ende esto provocara una disminución considerable en la absorción de agua y nutrientes, dependiendo el grado de afectación esta plaga puede llevar hasta la muerte de la planta, en su etapa inmadura son de coloración blanca con una cabeza rojiza, estos en su etapa adulta salen del suelo en busca de alimentos.

Mosca de la fruta (*Anastrepha fraterculus* Wiedemann y *Ceratitis capitata* Wiedemann): En este insecto los que logran ocasionar un mayor daño son las larvas, ya que estas se nutren de la pulpa de las frutas lo que conlleva a que existan daños en el fruto y caídas prematuras del mismo que generan grandes pérdidas a nivel productivo y económico.

Enfermedades

Márquez Janet et al. (2016) y García et al. (2018), mencionaron en sus investigaciones que las principales enfermedades que atacan al cultivo de arándano son:

Pudrición radicular (*Phytophthora cinnamomi* Rands): Los principales síntomas que podemos observar en el cultivo de arándano ante la presencia de esta enfermedad es la aparición de un tipo de goma en el cuello de la planta que se desarrolla con la aparición de canchales, que suelen necrosar a las raíces y estas toman una coloración negra, se visualizan en las nervaduras de las hojas un amarillamiento que poco a poco cubre la totalidad de la hoja y finaliza con una defoliación.

***Botrytis cinerea* Pers:** Genera en la planta una pudrición húmeda principalmente en las hojas y flores hasta llegar al fruto, esta llega a ser visualizada con una coloración marrón para luego recubrirse de un conglomerado de esporas color gris en forma de algodón, es necesario evitar que el cultivo se desarrolle en ambientes demasiado húmedos ya que lo exponemos a este tipo de enfermedad.

Antracnosis del fruto (*Colletotrichum acutatum* Simmonds): Este puede llegar a dañar flores, ramas y hojas pero el daño mayor lo realizan en el fruto, su presencia en el cultivo de arándano requiere de análisis y un tratamiento específico ya que la planta no puede presentar síntomas pero al momento de la post cosecha llegan a generar grandes pérdidas, la infección por lo general se da en floración pero los síntomas se logran apreciar en el fruto ya que estos suelen presentar machas necróticas huecas y en las hojas se diferencian manchas color marrón en formas circulares.

Monilia (*Monilinia vaccinii-corymbosi* Honey): Ataca con más severidad al cultivo de arándano causando pérdidas productivas y económicas, que llegan a afectar a los frutos, flores, brotes y hojas ocasionado déficit en la cosecha, un síntoma claro de la infección se da en las hojas ya que estas se marchitan al mismo tiempo que las nuevas emergen con una tonalidad rosada para luego pasar a marrón, en los frutos no se observan daños sino hasta su madurez.

Tizón de ramas del arándano (*Phomopsis vaccinii* Shear): Este hongo no causa solo la muerte del tallo sino de la planta mismo, este ingresa en las yemas florales para luego dirigirse al tallo, es allí donde la sintomatología se empieza a visualizar en los brotes jóvenes ya que el tejido necrótico se expande de la yema afectada por las ramas produciendo grandes canchales, logrando así disminuir la producción de frutos y generar manchas en las hojas.

1.3.8. Medio de cultivo y hormonas

Murashige y Skoog: Es utilizado en la mayoría de las especies por su alta concentración salina, sin embargo, no es utilizable en especies intolerantes a la salinidad. Además de su característica salina posee macronutrientes, micronutrientes y vitaminas (**Rodríguez et al., 2014**).

Tabla 3. Composición del medio de cultivo Murashige y Skoog.

COMPOSICIÓN DE MURASHIGE Y SKOOG			
INGREDIENTES	mg/L	INGREDIENTES	mg/L
MACRONUTRIENTES		VITAMINAS	
Nitrato de amonio	1,650	i-Inositol	100
Cloruro de calcio	440	Niacina	0.5
Sulfato de magnesio	370	Piridoxina-HCl	0.5
Fosfato de potasio	170	Tiamina-HCl	0.1
Nitrato de potasio	1,900	Glicinas	2
MICRONUTRIENTES			
Ácido bórico	6.2	Sulfato de manganeso	22.3
Cloruro de cobalto	0.025	Yoduro de potasio	0.83
Sulfato cúprico	0.025	Molibdato de sodio	0.25
Sulfato ferroso	27.8	Sulfato de zinc	8.6
		Na₂ EDTA-2H₂O	37.2

Fuente: (Samir, 2008)

Woody Plant Medium: Desde su formulación es utilizado para propagación de muchas especies vegetales principalmente forestales y frutales; su composición se basa en nutrientes inorgánicos, sales, vitaminas y aminoácidos. Se encarga de proporcionar los macros y microelementos para el cultivo *in vitro* (Rodríguez & Morales, 2015).

Tabla 4. Composición l medio de cultivo Woody Plant Medium

COMPOSICIÓN DE WOODY PLANT MEDIUM			
INGREDIENTES	mg/L	INGREDIENTES	mg/L
MACRONUTRIENTES		MICRONUTRIENTES	
Nitrato de amonio	400.000	Ácido bórico	6.200
Cloruro de calcio	72.500	Sulfato de cobre pentahidratado	0.025
Nitrato de calcio monohidratado	386.340	Sal disódica dihidratada de EDTA	37.300
Sulfato de magnesio	180.690	Sulfato ferroso heptahidratado	27.800
Fosfato potásico monobásico	170.000	Sulfato de magnesio monohidratado	22.300
Sulfato de potasio	990.000	Ácido molibdico (sal sódica)	0.213
VITAMINAS		Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
Myo-Inositol	100.000	AMINOÁCIDO	
Ácido nicotínico (ácido libre)	0.500	Glicina	2.000
HCl de piridoxina	0.500	CARBOHIDRATO	
Clorhidrato de tiamina	1.000	Sacarosa	20000.000

Fuente: (Ružić et al., 2012)

Zeatina: Esta fitohormona ayuda en la geminación manteniendo equilibrada la dormancia y retarda el envejecimiento de hojas y frutos. Su característica principal es estimular la germinación de semillas, desarrollo de frutos, romper el letargo de semillas; finalmente estimula la formación de brotes, floración y rompe la dormancia apical (**Brenes et al., 2015**).

(2-isopentenilo) adenina: Es un regulador de crecimiento que estimula la división celular, crecimiento y desarrollo utilizado en los cultivos *in vitro* para la obtención de callos (**Hine & Abdelnour, 2013**).

Auxinas: Son reguladores de crecimiento de origen vegetal que generan agrandamiento, elongación celular e intervienen en diferentes procesos de crecimiento vegetal de las plantas, al adicionarse en el medio de cultivo ayudan a las plantas a regenerarse para que se adapten en el cultivo *in vitro*; al utilizarse en bajas concentraciones incrementa la estimulación del crecimiento y desarrollo radicular. Además, que están involucradas en la dominancia apical, tropismos, abscisión y enraizamiento para asegurar el éxito al trasplantarse a condiciones *ex vitro* (**Rodríguez & Morales, 2015**).

Ácido indolacético (AIA): Se encuentra en concentraciones nano molares por su molécula se destruye fácilmente por oxidación y es muy poco estable; además se descompone rápidamente en los tejidos de la planta. Es un ácido utilizado para promover la iniciación radicular en cultivos *in vitro* o *ex vitro* (**Rodríguez & Morales, 2015**).

Ácido indolbutírico (AIB): Es un compuesto endógeno más eficiente que AIA ayuda a la formación de raíces laterales en su actividad de fitohormona es débil haciendo muy eficiente cómo estimulante en las raíces debido a que se desplaza muy poco (**Rodríguez & Morales, 2015**).

Ácido naftalenacético (ANA): El uso del ácido naftalenacético favorece el desarrollo de raíces cortas y gruesas se debe utilizar en concentraciones bajas debido a que las concentraciones altas ponen en peligro a las plantas dañando sus tejidos porque pueden producir raíces gruesas y atrofiadas (**Barker & Collins, 2011; Rodríguez & Morales, 2015**).

Giberelina: Son hormonas de crecimiento presentes en diferentes procesos de división y elongación celular de los tallos, ayudan en la regeneración de plantas *in vitro* con el cultivo de meristemas; utilizado con el objetivo de eliminar una serie de patógenos en las plantas madres, en la micropropagación *in vitro* se requiere el ácido giberélico en la primera fase para el éxito de su establecimiento, por otro lado también se puede utilizar esta hormona para realizar un tratamiento previo a las plantas madres para estimular su crecimiento en condiciones altas de temperatura y humedad (**Barker & Collins, 2011**).

Citoquininas: Son reguladores de crecimiento vegetal de origen natural que se encuentra en las partes más jóvenes de las plantas y raíces proveniente de la adenina; Se encuentran en las plantas en forma de nucleósidos y nucleótidos para promover la proliferación celular en el desarrollo y crecimiento de la planta como tallos, nodos y raíces su mecanismo de acción es regulado con la interacción de proteínas reguladoras y la cromatina (**Jiménez & Abdelnour, 2018**).

1.3.9. Métodos de propagación

El arándano generalmente se propaga mediante enraizamiento por estacas, este método de propagación tiene varias desventajas como: bajo porcentaje de enraizamiento, plantas de gran tamaño, poco desarrollo radicular y el número de ramas son improductivas (**Jiménez & Abdelnour, 2018**). Dando espacio a la técnica de micropropagación *in vitro* con mejores características como: excelente brotación lateral y producción de botones florales lo cual permite que la planta sea más productiva y que esté libre de patógenos asegurando plantas idénticas a la planta madre (**Litwińczuk, 2013**).

Propagación por estaquillas: Se basa en utilizar estacas de plantas de madera dura libres de plagas y enfermedades, teniendo las siguientes características: leñosas o semi leñosas libre de patógenos, ramas previamente fructificadas, debe tener de 2 a 3 yemas en buenas condiciones. Se selecciona 3 varetas de 35 cm aprox. de longitud con un diámetro de 1 cm con 2 a 3 yemas en óptimas condiciones; se coloca directamente en el sustrato utilizando reguladores de crecimiento al cabo de 2 meses estará lista para el trasplante (**Jiménez & Abdelnour, 2018**).

Propagación por acodo: Se debe utilizar un acodo con presencia de raíces en el tallo que este adherido a la planta madre; generando plantas la propagación de plantas hijas idénticas a la progenitora (**Hine & Abdelnour, 2013; Jiménez & Abdelnour, 2018**).

Propagación por raíz o fragmentos de tallo subterráneo: Se utiliza fragmentos de raíces de plantas élites, se toman fragmentos de 10 a 15 cm lo longitud con 1 a 5 cm de diámetro con una brotación de 2 a 3 yemas para garantizar la propagación exitosa (**Samir, 2008**).

Propagación *in vitro*: El objetivo de este método es estimular la totipotencia celular utilizando técnica de regeneración, organogénesis, diferenciación, multiplicación de yemas axilares y embriogénesis para regenerar una planta a partir de un explante. La morfogénesis depende de un balance fitohormonal del medio del cultivo, se utilizan citoquininas para estimular el desarrollo de nuevas plantas a partir de yemas axilares (**Brenes et al., 2015; Hine & Abdelnour, 2013**).

1.3.10. Etapas del cultivo *in vitro*

Fase: Preparación de la planta madre

Se basa en elegir y preparar un explante bajo condiciones controladas libre de contaminación de microorganismo y oxidación del explante para incidir en la calidad. Una vez elegida la planta madre se debe establecer las condiciones *in vitro*. El material joven obtenido de la planta madre muestra mejor respuesta al establecimiento. Se recomienda hacer crecer las plantas madre bajo condiciones de invernáculo para influir en su asepsia y calidad del explante controlando la luminosidad, temperatura y reguladores de crecimiento (**Hine & Abdelnour, 2013**).

En esta fase se deben extraer fragmentos de la planta madre denominados explantes estos pueden ser yemas, trozos de hojas, porciones de tallos, etc. Posterior a la extracción de los explantes, se debe realizar su desinfección en la cámara de flujo laminar para eliminar contaminantes externos como hongos y bacterias; y así poder mantener las condiciones de asepsia durante todo el proceso de la micropropagación (**Ružić et al., 2012**).

Fase: Establecimiento del cultivo

Durante esta fase se establece cultivos viables, teniendo en cuenta los explantes que se van a utilizar. Se debe controlar la selección, aislamiento y esterilización del explante. El explante con mayor capacidad regenerativa es obtenido del tejido meristemático (Baldo et al., 2017). Esta fase consiste en colocar los explantes desinfectados en el medio de cultivo estéril durante un periodo de 7 a 15 días para poder iniciar con el proceso de germinación o regeneración de nuevos tejidos iniciando la micropropagación *in vitro* (Rache Cardenal & Pacheco Maldonado, 2010).

Fase: Multiplicación

El objetivo de esta fase es la multiplicación de brote comprende de dos periodos: fase de inducción y multiplicación. Las plantas sobrevivientes que cuenten con brotes nuevos en cada yema se sub cultivan en frascos o tubos de ensayo que contengan medios de cultivo con dosis adecuadas de reguladores de crecimiento como citoquinina que favorecen la multiplicación (Rache Cardenal & Pacheco Maldonado, 2010). Todas estas actividades se las debe realizar en las cámaras de flujo laminar que garantice la asepsia y evite la contaminación del medio. En esta fase se obtiene mayor número de plantas *in vitro* (Ružić et al., 2012).

Fase: Enraizamiento

Para esta fase se utilizan brotes multiplicados *in vitro* con un tamaño aproximando de 2 cm los brotes obtenidos en esta fase se deben trasladar a un medio donde contenga reguladores de crecimiento (auxinas) dependiendo las necesidades de cada especie en muchos casos la multiplicación y enraizamiento ocurre en la misma fase sin necesidad de realizar la etapa de multiplicación **(Ružić et al., 2012)**.

Fase 5: Aclimatación

El éxito o fracaso de la micropropagación *in vitro* depende de la etapa de aclimatación porque las plantas extraídas de la fase de enraizamiento sufren cambios bruscos en sus condiciones ambientales teniendo pocas probabilidades de sobrevivir **(Ružić et al., 2012)**. Se le brinda condiciones para su óptimo desarrollo como iluminación solar, se controla la humedad ambiental, se usa sustratos desinfectados, se proporciona microorganismos benéficos con el objetivo de tener un correcto desarrollo **(Hine & Abdelnour, 2013)**.

1.4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.4.1. Hipótesis

Mediante el establecimiento de segmentos nodales en el medio de cultivo WPM se podría conformar un banco de plantas donantes de arándano variedad Biloxi *in vitro*.

1.4.2. Objetivos

Objetivo general

Establecer segmentos nodales en el medio de cultivo WPM para conformar un banco de plantas donantes de arándanos variedad Biloxi (*Vaccinium corymbosum* L.) *in vitro*.

Objetivos específicos

1. Establecer segmentos nodales en el medio de cultivo WPM.
2. Determinar la influencia de los reguladores de crecimiento y factores del ecosistema *in vitro* en el establecimiento de segmentos nodales.
3. Conformar un banco de plantas donantes con características juveniles.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Ubicación del experimento

La investigación se desarrolló en el laboratorio de biotecnología vegetal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato ubicada en el cantón Cevallos, situación en la provincia de Tungurahua. Las coordenadas geográficas son. 01° 24' 27" de latitud Sur y 78° 35' 00" de longitud al Oeste, ubicado a 19,31 km, al Sureste de Ambato.

2.2. Características del lugar

Para la fase de micropropagación de las plantas de arándano variedad Biloxi se realizó en el laboratorio de Biotecnología Vegetal el cual está instalado en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato en el sector el Tambo, perteneciente al Cantón Cevallos, provincia de Tungurahua. Se encuentra a una altitud de 2865 msnm.

2.3. Equipos y materiales

2.3.1. Material experimental

El material experimental consistió en segmentos nodales de plantas de arándanos del banco de plantas donantes (*V. corymbosum*), variedad Biloxi de la FCAGP-UTA las mismas que permanecieron en bolsas de plástico de 4 lb con sustrato TS 4 en condiciones controladas con fertilización edáfica y foliar.

2.3.2. Equipos

Establecer segmentos nodales en el medio de cultivo WPM.

- Autoclave (M11 UltraClave).
- Balanza de precisión (OHAUS).
- Cabina de flujo laminar (LABCONCO-REPC.11-01).
- pH metro (BANTE).
- Destilador de agua (MILLOPONE).

2.3.3. Materiales

Para establecer los segmentos nodales en el medio de cultivo WPM se utilizaron los siguientes materiales:

- Plantas de arándano variedad Biloxi.
- Sustrato TS4 (Turba rubia).
- Bandejas metálicas.
- Medio de cultivo WPM (PhytoTech Labs).
- Frascos de vidrio (250 ml).
- Adhesivos.
- Cucharillas metálicas.
- Vaso de precipitación (10 y 25 ml).
- Hojas de bisturí (# 22).
- Phytigel (SIGMA CAT).
- Pinzas metálicas.
- Alcohol al 70% y 96%.
- Hipoclorito de sodio al 5%.

- Mechero de alcohol.
- Papel de cocina.
- Fundas plásticas.
- Recipientes de esterilización plásticos.
- Estantes metálicos.
- Papel aluminio.
- Cajas Petri (100mm*15mm).
- Probetas (50 ml).
- Matraz erlenmeyer (250 ml).
- Detergente sólido y líquido.
- Agua esterilizada.
- Marcadores permanentes (Sharpie).
- Toallas de papel.
- Jarras volumétricas (1 L) Consuplast.
- Gorros quirúrgicos (cofia).
- Bata quirúrgica.
- Mascarillas.
- Sacarosa (Azúcar blanca Valdez).
- 2-iP (N-isopentil adenina) Caisson labs.
- TDZ (Thidiazuron) Caisson labs.
- AIA (Ácido Indol Acético).
- IBA (Ácido indol -3- butírico) SIGMA.
- ANA (Ácido 1- naftalenacético).
- Ácido cítrico (Casa del químico).
- Acido ascórbico (Casa del químico).
- Cisteína (Casa del químico).

2.4. Factores de estudio

2.4.1. Objetivo 1. Establecer segmentos nodales en el medio de cultivo WPM.

2.4.1.1. Factor 1. Influencia de la consistencia del medio de cultivo en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de arándanos (*V. corymbosum*) variedad Biloxi.

2.4.1.2. Factor 2. Influencia de la procedencia del explante en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de arándanos (*V. corymbosum*) variedad Biloxi.

2.4.1.3. Factor 3. Influencia de la frecuencia de subcultivo en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de arándanos (*V. corymbosum*) variedad Biloxi.

2.4.2. Objetivo 2. Determinar la influencia de los reguladores de crecimiento y factores del ecosistema *in vitro* en el establecimiento de segmentos nodales.

2.4.2.1. Factor 1. Influencia del tipo de auxinas y sus concentraciones en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de arándanos (*V. corymbosum*) variedad Biloxi.

2.4.2.2. Factor 2. Influencia del tipo de citoquininas y sus concentraciones en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de arándanos (*V. corymbosum*) variedad Biloxi.

2.4.2.3. Factor 3. Influencia de condiciones de iluminación en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de arándanos (*V. corymbosum*) variedad Biloxi.

2.4.2.4. Factor 4. Influencia del tipo de antioxidante y sus concentraciones en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de arándanos (*V. corymbosum*) variedad Biloxi.

2.4.3. Objetivo 3. Conformar un banco de plantas donantes de (*V. corymbosum*) con características juveniles *in vitro*.

2.4.3.1. Factor 1. Influencia del tipo de frasco sobre las características juveniles de las plantas de arándanos (*V. corymbosum*) variedad Biloxi.

2.4.3.2. Factor 2. Influencia del agente gelificante sobre las características juveniles de las plantas de arándanos (*V. corymbosum*) variedad Biloxi.

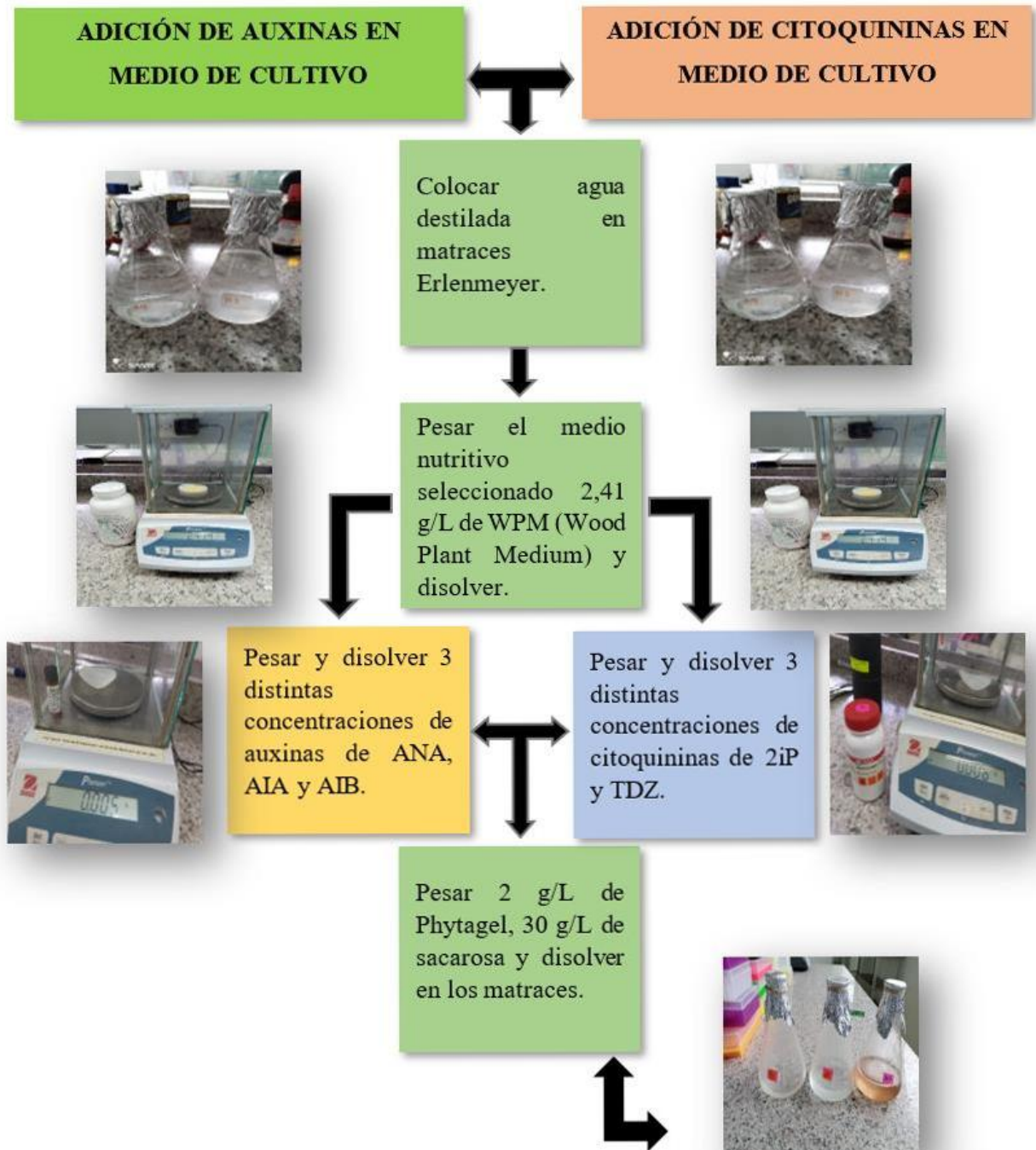
2.5. Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar.

2.6. Manejo del experimento

1. Para el establecimiento de los segmentos nodales de arándano Var. Biloxi *in vitro* con adición de auxinas y citoquininas se siguió el procedimiento que aparece en el **Gráfico 1**.
2. Para la determinación de la influencia del tipo de antioxidante y las diferentes condiciones de iluminación *in vitro* en el establecimiento de segmentos nodales de arándano Var. Biloxi se siguieron los siguientes procedimientos descritos en el **Gráfico 2**.
3. Para la determinación de la influencia del agente gelificante y el tipo de frasco en el establecimiento de segmentos nodales de arándano Var. Biloxi *in vitro* se siguieron los siguientes procedimientos descritos en el **Gráfico 3**.
4. Para el establecimiento de segmentos nodales de arándano Var. Biloxi *in vitro* se siguieron los siguientes procedimientos descritos en el **Gráfico 4**.

2.6.1. Gráfico 1. Determinación de la influencia de los reguladores de crecimiento en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de arándanos (*V. corymbosum*) variedad Biloxi.





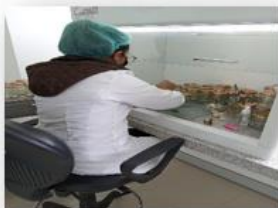
Sellar con papel aluminio los matracos y con una liga ajustarlos.



Autoclavar los matracos Erlenmeyer con los medios por 40 minutos a una temperatura 110°C.



Retirar los matracos Erlenmeyer y los frascos y dejarlos reposar en cámara de flujo laminar.



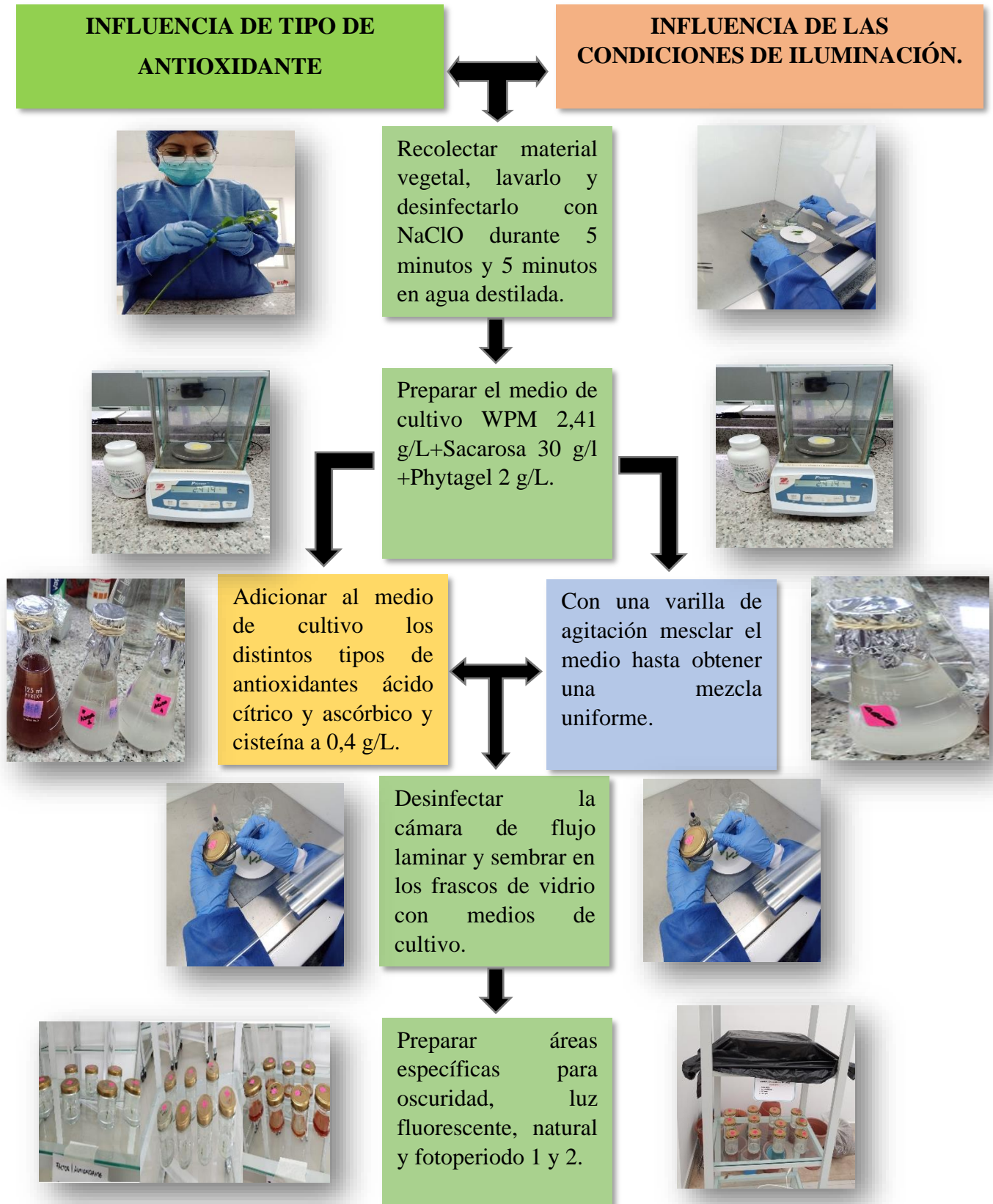
Desinfectar la cámara de flujo laminar con alcohol y sembrar los explantes en los frascos de vidrio.



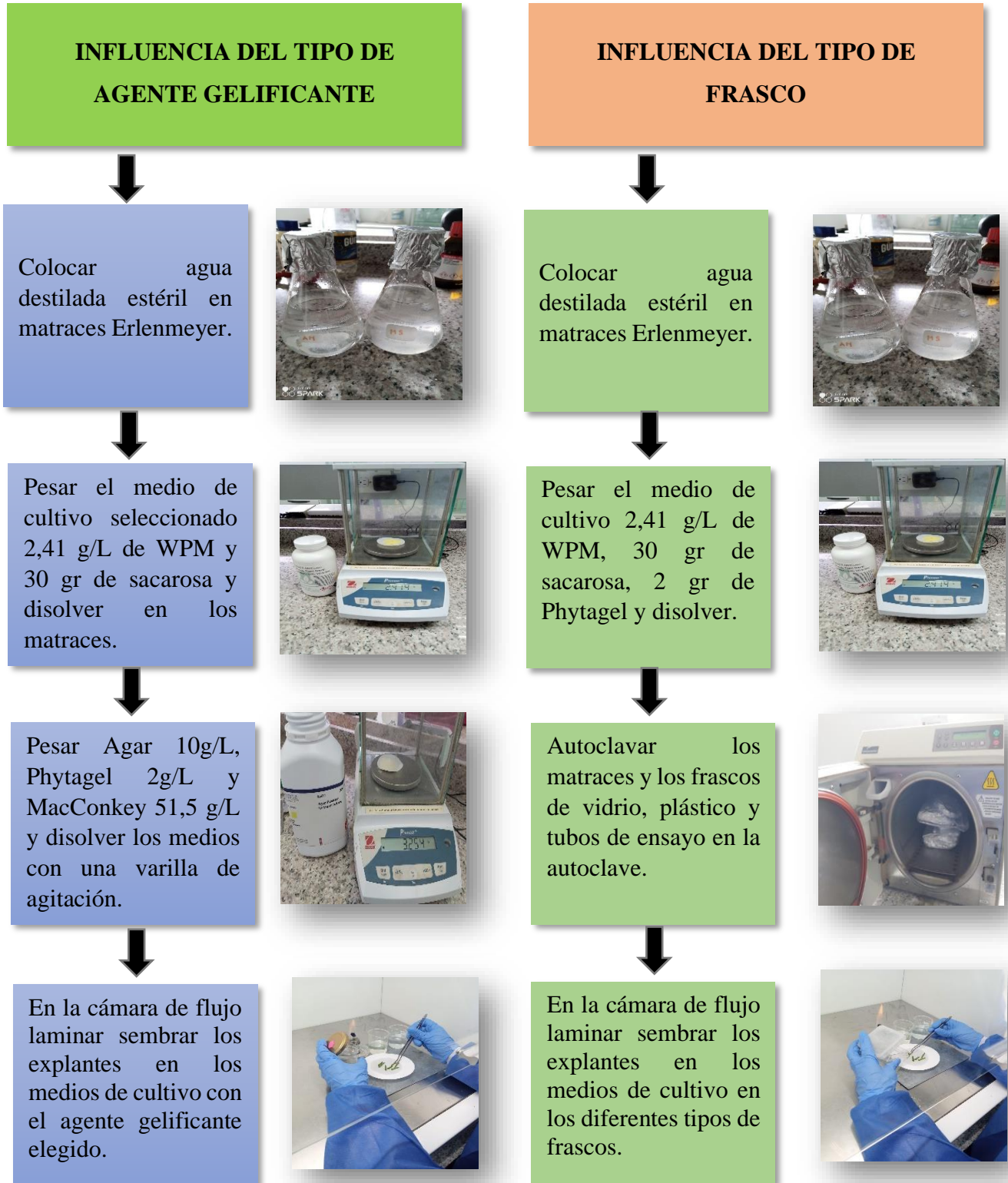
Colocar los frascos en el área de incubación y aclimatación con una temperatura de 24 °C y luces fluorescentes.



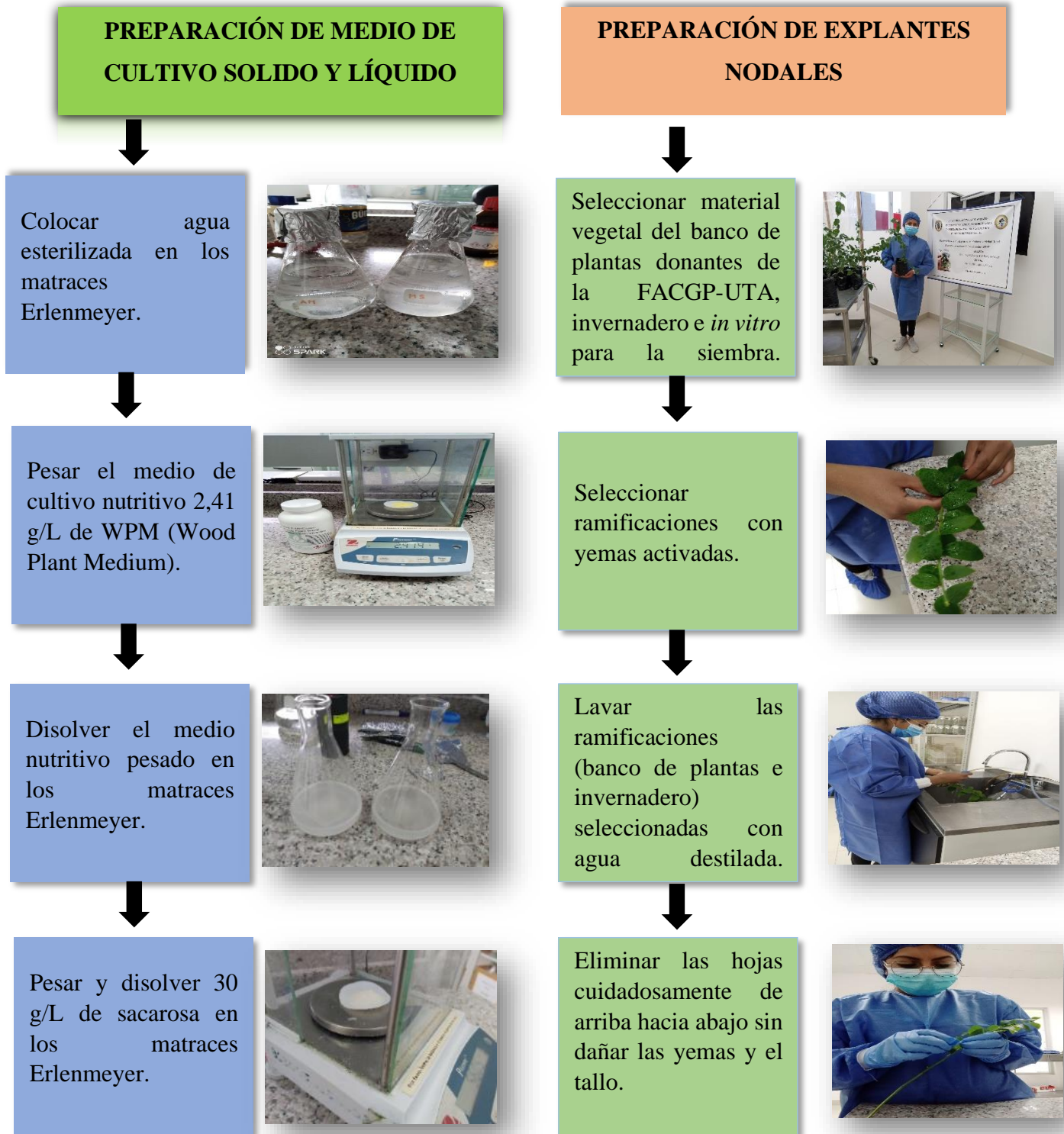
2.6.2. Gráfico 2. Determinación de la influencia del tipo de antioxidante y luminosidad *in vitro* en el establecimiento de segmentos nodales de arándano Var. Biloxi.



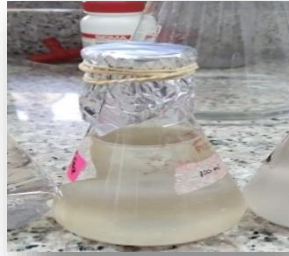
2.6.3. Gráfico 3. Determinación del tipo de agente gelificante y la influencia del tipo de frasco de arándanos (*V.corymbosum*) con características juveniles *in vitro*.



2.6.4. Gráfico 4. Establecimiento de segmentos nodales en el medio de cultivo WPM.



Colocar 2 g/L de Phytigel en los medios y aforar a la cantidad deseada y mezclar con una barrilla de agitación.



Colocar agua esterilizada en un matraz Erlenmeyer y tapar con papel aluminio.



En 1 matras Erlenmeyer con medio de cultivo WPM+ sacarosa no colocar agente gelificante.



Preparar la solución de desinfección superficial para los explantes al 60% de NaClO.



Enjuagar con agua destilada y NaClO los frascos de vidrio de 250 ml y los tubos de ensayo.



Colocar en envases distintos agua destilada y la solución de NaClO.



Autoclavar los matraces Erlenmeyer con los medios por un periodo de 40 minutos a una temperatura 110°C



Con la ayuda de una base metálica cortar explantes de 1 a 2 cm de longitud con 1 yema activada.



Autoclavar los frascos de vidrio y tubos de ensayo por un periodo de 40 minutos a una temperatura 110°C



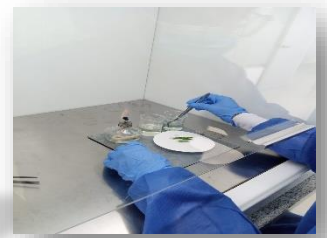
Colocar los explantes cortados en la solución de NaClO por 5 minutos, luego por 5 minutos en agua esterilizada.



Retirar los frascos y tubos de ensayo autoclavados y los matraces con los medios de cultivo.



Sobre cajas Petri colocar papel filtro o de cocina para dejar secar los explantes anteriormente desinfectados.



MANEJO DE ENSAYO EN CÁMARA DE FLUJO LAMINAR

Esterilizar pinzas, mangos de bisturí, papel de cocina, cajas Petri, vasos de precipitación, cuadros de metal y tiras de papel filtro en la autoclave por 40 minutos a una temperatura de 110°C.



Desinfectar los materiales que no fueron esterilizados como mecheros de alcohol, cuchillas de bisturí, chisquetes con alcohol, encendedor, gradillas y cronometro además de limpiar la cámara de flujo laminar con alcohol.

Encender los mecheros de alcohol cerca de los frascos, destapar individualmente los frascos y tubos de ensayo con medio de cultivo, flamear la pinza sobre el mechero y sembrar el explante con yemas activadas.



Colocar los frascos y tubos sembrados en el área de incubación y aclimatación con una temperatura de 24 °C y luces fluorescentes.

2.7. Tratamientos

2.7.1. Objetivo 1. Establecer segmentos nodales en el medio de cultivo WPM.

Factor 1. Influencia de la consistencia del medio de cultivo en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de arándanos (*V. corymbosum*) variedad Biloxi.

- **T1.** Plantas en medio semisólido.
- **T2.** Plantas en medio líquido.

Factor 2. Influencia de la procedencia del explante en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de arándanos (*V. corymbosum*) variedad Biloxi.

- **T1.** Segmentos nodales (invernadero).
- **T2.** Segmentos nodales (condiciones *in vitro*).
- **T3.** Segmentos nodales (condiciones controladas).

Factor 3. Influencia de la frecuencia de subcultivo en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de arándanos (*V. corymbosum*) variedad Biloxi.

- **T1.** Subcultivo cada 15 días.
- **T2.** Subcultivo cada 30 días.

2.7.2. Objetivo 2. Determinar la influencia de los reguladores de crecimiento y factores del ecosistema *in vitro* en el establecimiento de segmentos nodales.

Factor 1. Influencia del tipo de auxinas y sus concentraciones en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de arándanos (*V. corymbosum*) variedad Biloxi.

Tabla 5. Concentración de auxinas ANA (Ácido 1-naftalenacético), AIA (Ácido indol-3-acético) Y AIB (Ácido indol-3-butírico).

CONCENTRACIONES DE AUXINAS			
ANA	AIA	AIB	CONTROL
T1 100ppm ANA	T1 100 ppm AIA	T1 300 ppm AIB	SIN AUXINAS
T2 200ppm ANA	T2 150 ppm AIA	T2 400 ppm AIB	
T3 250ppm ANA	T3 200 ppm AIA	T3 500 ppm AIB	
T4 300ppm ANA	T4 250 ppm AIA	T4 600 ppm AIB	
T5 350ppm ANA	T5 300 ppm AIA	T5 700 ppm AIB	

Elaborado por: Viviana Toapanta

Tabla 6. Preparación de auxinas a distintas concentraciones ANA (Ácido 1-naftalenacético), AIA (Ácido indol-3-acético) Y AIB (Ácido indol-3-butírico).

Preparar un volumen de 1000 ml de H₂O. 30 gr de sacarosa, 2,41 de medio WPM, 2 gr de Phytigel.

ANA		AIA		AIB	
SOLUCIÓN MADRE	AGUA	SOLUCIÓN MADRE	AGUA	SOLUCIÓN MADRE	AGUA
10 ml	90 ml	10 ml	90 ml	30 ml	70 ml
20 ml	80 ml	15 ml	85 ml	40 ml	60 ml
25 ml	75 ml	20 ml	80 ml	50 ml	50 ml
30 ml	70 ml	25 ml	75 ml	60 ml	40 ml
35 ml	65 ml	30 ml	70 ml	70 ml	30 ml

Elaborado por: Viviana Toapanta

Factor 2. Influencia del tipo de citoquininas y sus concentraciones en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de arándanos (*V. corymbosum*) variedad Biloxi.

Tabla 7. Concentración de citoquininas 2-iP y THIDIAZURON.

CONCENTRACIONES DE CITOQUININAS		
2-iP	THIDIAZURON	CONTROL
T1 2 ppm 2iP	T1 0.01 ppm Thidiazuron	SIN CITOQUININAS
T2 3 ppm 2iP	T2 0.05 ppm Thidiazuron	
T3 4 ppm 2iP	T3 0.1 ppm Thidiazuron	
T4 5 ppm 2iP	T4 1.0 ppm Thidiazuron	
T5 6 ppm 2iP	T5 1.5 ppm Thidiazuron	

Elaborado por: Viviana Toapanta

Tabla 8. Preparación de citoquininas a distintas concentraciones 2- iP y THIDIAZURON.

Preparar un volumen de 1000 ml de H₂O. 30 g de sacarosa, 2,41 de medio WPM, 2 g de Phytigel.

2- iP		THIDIAZURON	
SOLUCIÓN MADRE	AGUA	SOLUCIÓN MADRE	AGUA
2 ml de 2iP	98 ml	0.001 ml	99.999 ml
3 ml de 2iP	97 ml	0.05 ml	99.95 ml
4 ml de 2iP	96 ml	0.1 ml	99.9 ml
5 ml de 2iP	95 ml	1.0 ml	99 ml
6 ml de 2iP	94 ml	1.5 ml	98.5 ml

Elaborado por: Viviana Toapanta

Factor 3. Influencia de condiciones de luminosidad en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de arándanos (*V. corymbosum*) variedad Biloxi.

- **T1.** Plantas en condiciones de oscuridad.
- **T2.** Plantas en condiciones de luz blanca fluorescente.
- **T3.** Plantas en condiciones de luz natural.
- **T4.** Plantas en condiciones de fotoperiodo 1 (24 horas luz blanca/ 24 horas oscuridad).
- **T5.** plantas en condiciones de fotoperiodo 2 (24 horas luz natural/ 24 horas oscuridad).

Factor 4. Influencia del tipo de antioxidante y sus concentraciones en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de arándanos (*V. corymbosum*) variedad Biloxi.

- **T1.** WPM +Ácido cítrico.
- **T2.** WPM + Ácido ascórbico.
- **T3.** WPM + Cisteína.

Tabla 9. Preparación del agente antioxidante Ácido cítrico, Ácido ascórbico y Cisteína.

ÁCIDO CÍTRICO	ÁCIDO ASCÓRBICO	CISTEÍNA
0,30 g de medio WPM.	0,30 g de medio WPM.	0,30 g de medio WPM.
3,75 g de sacaros.	3,75 g de sacaros.	3,75 g de sacaros.
0,05 g de ácido cítrico.	0,05 g de ácido cítrico.	0,05 g de ácido cítrico.
0,93 g de Phytigel.	0,93 g de Phytigel.	0,93 g de Phytigel.

Elaborado por: Viviana Toapanta

2.7.3. Objetivo 3. Conformar un banco de plantas donantes de (*V. corymbosum*) con características juveniles *in vitro*.

Factor 1. Influencia del tipo de frasco sobre las características juveniles de las plantas de arándanos (*V. corymbosum*) variedad Biloxi.

- **T1.** Frascos de vidrio hermético.
- **T2.** Frascos de plástico transparentes herméticos.
- **T3.** Tubos de ensayo de vidrio.

Factor 2. Influencia del agente gelificante sobre las características juveniles de las plantas de arándanos (*V. corymbosum*) variedad Biloxi.

- **T1.** WPM + Phytigel.
- **T2.** WPM + Agar.
- **T3.** WPM + Macconkey Agar.

Tabla 10. Preparación del tipo de agente gelificante MaCconkey Agar, Phytigel y Agar.

MACCONKEY AGAR	PHYTAGEL	AGAR
0.30 g de medio WPM.	0.30 g de medio WPM.	0.30 g medio WPM.
6.43 g de makonkey agar.	0.93 g de Phytigel.	1.25 g de agar.
3.75 g de sacarosa.	3.75 g de sacarosa.	3.75 g de sacarosa.

Elaborado por: Viviana Toapanta

2.8. Variables respuesta

Objetivo 1. Establecer segmentos nodales en el medio de cultivo WPM.

$$\% \text{ de establecimiento} = \frac{\text{de segmentos nodales prendidos}}{\text{de segmentos nodales por tratamiento}} * 100$$

Objetivo N2. Determinar la influencia de los reguladores de crecimiento y factores del ecosistema *in vitro* en el establecimiento de segmentos nodales.

Porcentaje de contaminación

Esta variable fue evaluada mediante los siguientes rangos

2= presencia de contaminantes

1= ausencia de contaminantes

$$\% \text{ de contaminación} = \frac{n^{\circ} \text{ de segmentos nodales contaminados}}{n^{\circ} \text{ de segmentos nodales por tratamiento}} * 100$$

Objetivo N3. Conformar un banco de plantas donantes con características juveniles.

Porcentaje de contaminación

Esta variable fue evaluada mediante los siguientes rangos

2= presencia de contaminantes

1= ausencia de contaminantes

$$\% \text{ de contaminación} = \frac{n^{\circ} \text{ de segmentos nodales contaminados}}{n^{\circ} \text{ de segmentos nodales por tratamiento}} * 100$$

2.9. Procesamiento de la información

Los datos registrados fueron analizados mediante el paquete estadístico SPSS versión 26.0. Para esto se evaluaron los criterios de distribución normal mediante la prueba de Kolmogorov Smirnov y para determinar la homogeneidad de varianza se utilizó la prueba de Levene. Para aquellas variables cuyos datos cumplieron con los 2 requerimientos se desarrolló un ANOVA de clasificación simple. Para separar las medias se utilizó la prueba de Tuckey. Para las variables cuyos datos no cumplieron con los requerimientos de normalidad y homogeneidad de varianza se utilizó para la prueba de Kruskal Wallis completado con una prueba de U Man Whitney. Para obtener un nivel de significación de un 95%.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Establecimiento de segmentos nodales de arándano en el medio de cultivo WPM.

3.1.1. Influencia de la consistencia del medio de cultivo en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de arándanos (*V. corymbosum*) variedad Biloxi.

En relación al factor influencia de la consistencia del medio se logró observar que no existieron diferencias estadísticas significativas entre los explantes establecidos en el medio semisólido (con Phytigel al 2%) y el medio sin agente gelificante (líquido) (**Figura 1 y Tabla 11**).

Tabla 11. Influencia de la consistencia del medio sobre el porcentaje de contaminación y el porcentaje de establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de plantas de arándanos (*V. corymbosum*) Var. Biloxi del banco de plantas donantes de la FCAGP-UTA a los 8, 15, 22 y 29 días.

TRATAMIENTOS	CONSISTENCIA DEL MEDIO			
	Porcentaje de contaminación a los 8, 15, 22 y 29 días		Porcentaje de establecimiento a los 8, 15, 22 y 29 días	
	Rango promedio	Medias \bar{X}	Rango promedio	Medias \bar{X}
Semisólido (Phytigel 2%)	20,50 a	0	20,50 a	100
Líquido	20,50 a	0	20,50 a	100

Elaborado por: Viviana Toapanta

Rangos promedios que en una misma columna tengan letras no comunes, difieren según la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n = 20$.

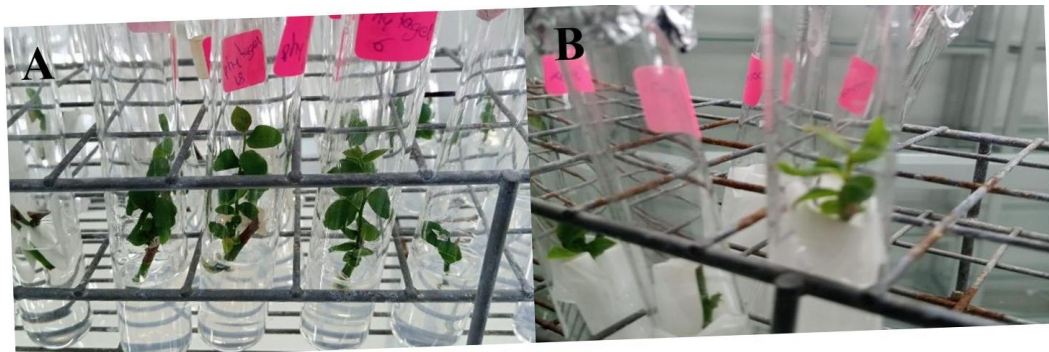


Figura 1. Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales en diferente consistencia del medio Semisólido (A) y Líquido con puente de papel filtro (B).

Según (Jiménez et al., 2018) señalaron que al colocar los segmentos nodales de arándanos en un medio de cultivo líquido con un puente de papel de filtro disminuyó la oxidación de los explantes, mejorando así las condiciones nutricionales, el crecimiento de los brotes y un mayor porcentaje de establecimiento *in vitro*. (Albany et al., 2015) señalaron que la utilización de puente de papel filtro en la etapa de establecimiento *in vitro* favoreció el crecimiento y la regeneración de brotes reduciendo costos, debido a la no utilización de agentes gelificantes.

A pesar de que no existieron diferencias en el presente trabajo en conclusión en la consistencia del medio de cultivo debemos mencionar que el uso del medio de cultivo líquido en tubos de ensayo permite incrementar el uso óptimo del espacio en cámaras de crecimiento con 160 frascos de vidrio y 840 tubos de ensayo por cada estantería colocada en el cuarto de aislamiento de la Universidad Técnica de Ambato puesto que en los tubos de ensayo en medio líquido se pueden colocar una mayor cantidad de brotes por volumen.

3.1.2. Influencia de la procedencia del explante en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de arándanos (*V. corymbosum*) variedad Biloxi.

Respecto a la procedencia del explante se logró observar que existieron diferencias estadísticas significativas entre la procedencia de los mismos. Los segmentos nodales tomados del banco de plantas donantes en fase de aclimatación y aquellos tomados desde invernaderos fueron los que mayor establecimiento *in vitro* lograron. Por otra parte, los explantes procedentes de plantas *in vitro* demoraron más tiempo en establecerse y crecieron más lentamente e incluso algunos se oxidaron (**Figura 2 y Tabla 12**).

Tabla 12. Influencia del tipo de explantes sobre el porcentaje de contaminación y el porcentaje de establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de plantas de arándanos (*V. corymbosum*) Var. Biloxi del banco de plantas donantes de la FCAGP-UTA a los 8,15, 22 y 29 días.

TIPO DE EXPLANTE				
TRATAMIENTO	Porcentaje de contaminación a los 8,15, 22 y 29 días		Porcentaje de establecimiento a los 8, 15, 22 y 29 días	
	Rango promedio	Medias \bar{X}	Rango promedio	Medias \bar{X}
Fase de aclimatación	8 a	0	10,50 a	100
Invernadero	8 a	0	10,50 a	100
<i>In vitro</i>	8 a	0	3 b	0

Elaborado por: Viviana Toapanta

Rangos promedios que en una misma columna tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n=5$.



Figura 2. Establecimiento in vitro de segmentos nodales con diferentes procedencias de explantes invernadero (A), condiciones controladas UTA (B) y *in vitro* (C).

Según (Brenes et al., 2015) mencionaron que el género *Vaccinium* al igual que diferentes especies leñosas provenientes de campo o invernadero en el proceso de establecimiento y el crecimiento de explantes *in vitro* existieron limitantes que limitaron el éxito de su establecimiento aspectos como la contaminación, oxidación posterior a la desinfección superficial a los tejidos a inocular, debido a que el medio proporciono condiciones apropiadas la proliferación de hongos y bacterias llegando a competir con los explantes provocando su muerte.

Además (Jiménez et al., 2018) en su investigación demostraron que las plantas de arándano adaptadas a condiciones de invernadero utilizadas para realizar los ensayos *in vitro* alcanzaron un 100 % de supervivencia. De igual manera (Azofeifa, 2009) mencionó que el establecimiento de tejidos vegetales cultivados *in vitro* de plantas leñosas estuvo limitado por la oxidación de los mismos porque luego de haber sido cortados estos liberaron exudados oscuros que presentaron una mezcla compleja de sustancias fenólicas ocasionando uno de los problemas más frecuentes en la fase de establecimiento *in vitro*.

Con este resultado se constató que la procedencia del explante influye en el establecimiento *in vitro* de la variedad Boloxi siendo los explantes de invernadero y de condiciones controladas obtuvieron 100% en su establecimiento a diferencia de los explantes de origen *in vitro* que presentaron oxidación y bajo porcentaje de establecimiento.

3.1.3. Influencia de la frecuencia de subcultivo en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de arándanos (*V. corymbosum*) variedad Biloxi.

En relación a la influencia de subcultivo en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de arándano se logró observar que no existieron diferencias estadísticas significativas entre las plantas subcultivadas *in vitro* a los 15 y 30 días. Sin embargo, los explantes subcultivados a los 30 días fueron los que mayor porcentaje de establecimiento presentaron con brotes más fuertes y grandes. Por otra parte, los explantes que fueron subcultivados a los 15 días tenían brotes más pequeños y débiles (**Figura 3 y Tabla 13**).

Tabla 13. Influencia de la frecuencia de subcultivo sobre el porcentaje de contaminación y el porcentaje de establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de plantas de arándanos (*V. corymbosum*) Var. Biloxi del banco de plantas donantes de la FCAGP-UTA a los 15 y 30 días.

FRECUENCIA DE SUBCULTIVO				
TRATAMIENTOS	Porcentaje de contaminación a los 15 y 30 días		Porcentaje de establecimiento a los 15 y 30 días	
	Rango promedio	Medias \bar{X}	Rango promedio	Medias \bar{X}
15 días	10,50 a	0	10,50 a	100
30 días	10,50 a	0	10,50 a	100

Elaborado por: Viviana Toapanta

Rangos promedios que en una misma columna tengan letras no comunes, difieren según la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n = 10$.



Figura 3. Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales con diferentes frecuencias de subcultivo 15 días (A) y 30 días (B).

Según (Liu et al., 2010) en su investigación mencionaron que la regeneración de brotes de arándanos variedad Biloxi que fueron subcultivados a 6 semanas de edad presentaron mayor frecuencia de regeneración de brotes a diferencia de los explantes que fueron subcultivados a 2 semanas debido a la variación genética del cultivar mientras más es el tiempo de subcultivo. Además (Brenes et al., 2015) mencionaron que la necrosis en explantes de arándano en la fase de micropropagación de arándano *in vitro* está relacionada con diferentes factores como disponibilidad de calcio, transpiración, acumulación de gases y compuestos como CO₂ y las más importante para reducir la necrosis en los tejidos de los explantes es la frecuencia de subcultivo.

Con el resultado obtenido en esta investigación se constató que la frecuencia de subcultivo en la micropropagación de arándano influye de manera positiva en el establecimiento *in vitro* de la variedad logrando obtener mayor número de explantes en menor tiempo además de brindar condiciones más adecuadas para su rápida proliferación de brotes y de hojas activas los explantes evaluados a los 15 días presentaron una longitud de 3 cm con 1 hoja y a los 30 días los explantes presentaron 4 hojas con una longitud de 3 cm.

3.2. Determinación de la influencia de los reguladores de crecimiento y factores del ecosistema *in vitro* en el establecimiento de segmentos nodales.

3.2.1. Influencia del tipo de auxinas y sus concentraciones en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de arándanos (*V. corymbosum*) variedad Biloxi.

En relación a la influencia del tipo de auxinas con diferentes concentraciones en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de arándano se logró observar que existieron diferencias estadísticas significativas, el tratamiento sin auxinas (Control) fue el que mostro mejores resultados en cuanto al porcentaje de establecimiento con el 100% y contaminación a diferencia de los tratamientos evaluados con 100, 200, 250, 300 y 350 ppm de auxinas que presentaron oxidación en todos los explantes (**Figura 4 y Tabla 14**).

Tabla 14. Influencia de diferentes concentraciones de Ácido naftalenacético (ANA) sobre el porcentaje de contaminación y el porcentaje de establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de plantas de arándanos (*V. corymbosum*) Var. Biloxi del banco de plantas donante de la FCAGP-UTA a los 8, 15, 22 y 29 días.

CONCENTRACIONES DE ÁCIDO NAFTALENACÉTICO (ANA)								
TRATAMIENTOS	Porcentaje de contaminación a los 8 días		Porcentaje de establecimiento a los 8 días		Porcentaje de contaminación a los 15, 22 y 29 días		Porcentaje de establecimiento a los 15, 22 y 29 días	
	Rango promedio	Medias \bar{X}	Rango promedio	Medias \bar{X}	Rango promedio	Medias \bar{X}	Rango promedio	Medias \bar{X}
ANA 100 ppm	15,50 a	0	15,00 b	0	15,00 b	0	13,50 b	0
ANA 200 ppm	15,50 a	0	15,00 b	0	15,00 b	0	13,50 b	0
ANA 250 ppm	15,50 a	0	15,00 b	0	15,00 b	0	13,50 b	0
ANA 300 ppm	15,50 a	0	15,00 b	0	15,00 b	0	13,50 b	0
ANA 350 ppm	15,50 a	0	15,00 b	0	15,00 b	0	13,50 b	0
Control	15,50 a	0	18,00 a	20	18,00 a	20	25,50 a	80

Elaborado por: Viviana Toapanta

Rangos promedios que en una misma columna tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n=5$.

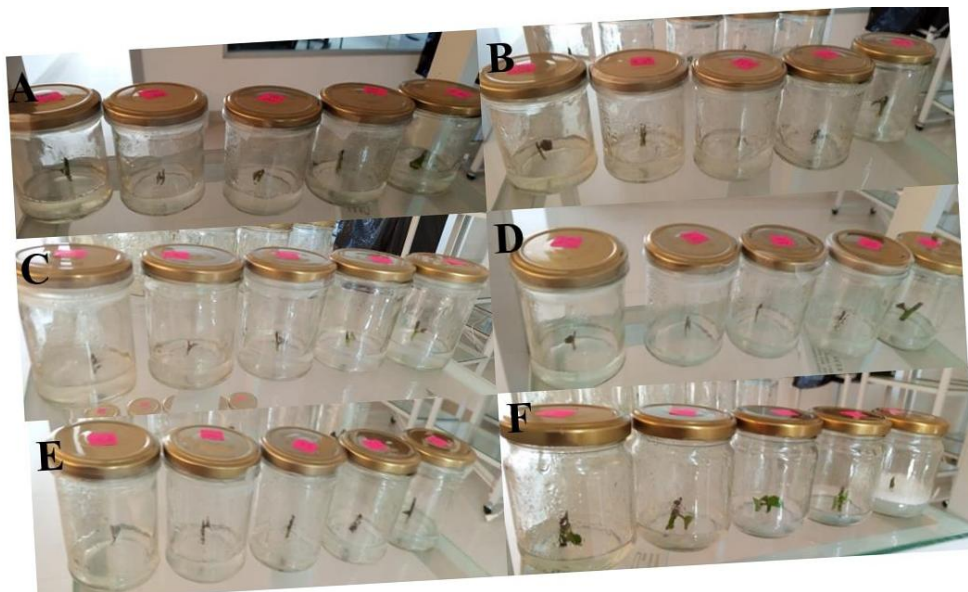


Figura 4. Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales con diferentes concentraciones de auxinas ANA 100 ppm (A), 200 ppm (B), 250 ppm (C), 300 ppm (D), 350 ppm (E), Control (F).

Según (Fan et al., 2017) en su investigación evaluaron el enraizamiento *in vitro* de (*V. corymbosum*) y un híbrido (*V. ashei* rabbiteye) y al adicionar ANA 0,27 $\mu\text{M/L}$ al medio de cultivo Anderson en su ensayo obtuvieron 75 % de enraizamiento para las 2 variedades recomendando que el protocolo utilizado sería de gran utilidad para la propagación rápida de cultivares de arándano. Además, estudios realizados por Campos et al. 2020 mencionaron que en la fase de enraizamiento *in vitro* los explantes de *Swietenia macrophylla* King (Caoba) con medio de cultivo WPM suplementado con ANA estimuló la formación de raíces en los explantes ya establecidos.

Con los resultados obtenidos en el ensayo realizado se constató que los tratamientos que fueron evaluados con adición de ANA en el medio de cultivo en concentraciones muy elevadas los explantes *in vitro* presentaron necrosamiento a diferencia de los explantes (control) además según lo mencionado por los autores la utilización de ANA en micropropagación de arándanos y de otras especies presenta mejores resultados en la fase de enraizamiento.

En relación a la influencia del tipo de auxinas con adición de AIA en el medio de cultivo WPM se logró observar a los 8 días no existieron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos en relación al porcentaje de contaminación. Sin embargo, en ese mismo periodo de tiempo se alcanzó un mayor porcentaje de establecimiento *in vitro* en los segmentos nodales colocados en el medio WPM sin Ácido indol acético (AIA). Por otra parte, el porcentaje de contaminación a los 15,22 y 29 días fue superior en los frascos suplementados con 100 y 150 ppm de AIA. Finalmente, el porcentaje de establecimiento *in vitro* en esas evaluaciones fue superior en los segmentos nodales que se establecieron en el medio de cultivo WPM sin AIA (**Figura 5 y Tabla 15**).

Tabla 15. Influencia de diferentes concentraciones de Ácido Indol Acético (AIA) sobre el porcentaje de contaminación y el porcentaje de establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de plantas de arándanos (*V. corymbosum*) Var. Biloxi del banco de plantas donante de la FCAGP-UTA a los 8, 15, 22 y 29 días.

CONCENTRACIONES DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO (AIA)								
TRATAMIENTOS	Porcentaje de contaminación a los 8 días		Porcentaje de establecimiento a los 8 días		Porcentaje de contaminación a los 15, 22 y 29 días		porcentaje de establecimiento a los 15, 22 y 29 días	
	Rango promedio	Medias \bar{x}	Rango promedio	Medias \bar{x}	Rango promedio	Medias \bar{x}	Rango promedio	Medias \bar{x}
AIA 100 ppm	15,50 a	0	13,00 b	0	19,50 a	40	13,00 b	0
AIA 150 ppm	15,50 a	0	13,00 b	0	19,50 a	40	13,00 b	0
AIA 200 ppm	15,50 a	0	13,00 b	0	13,50 b	0	13,00 b	0
AIA 250 ppm	15,50 a	0	13,00 b	0	13,50 b	0	13,00 b	0
AIA 300 ppm	15,50 a	0	13,00 b	0	13,50 b	0	13,00 b	0
Control	15,50 a	0	28,00 a	100	13,50 b	0	28,00 a	100

Elaborado por: Viviana Toapanta

Rangos promedios que en una misma columna tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n=5$.



Figura 5. Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales con diferentes concentraciones de auxinas AIA 100 ppm (A), 150 ppm (B), 200 ppm (C), 250 ppm (D), 300 ppm (E), Control (F).

Según (Cardenal et al., 2010) en su investigación de propagación *in vitro* de plantas adultas de *Vaccinium meridionale* mencionaron que la utilización del medio WPM suplementado con AIA durante la etapa de establecimiento *in vitro* obtuvo como resultado explantes necróticos a diferencia de los explantes con el medio de cultivo que no fueron suplementados con AIA caso contrario lo que sucedió en la fase de multiplicación y enraizamiento todo los explantes presentaron raíces de forma positiva.

Con el resultado obtenido en esta investigación se comprobó que el suplemento de AIA en el medio de cultivo en concentraciones muy elevadas ocasiona necrosamiento de los explantes *in vitro* a diferencia de los explantes control que no fueron suplementados con AIA que presentaron nuevos brotes con un tamaño de 3 cm y con 5 hojas activas al final de los 29 días de la evaluación además según lo mencionado por (Cardenal et al., 2010) la adición de AIA en el medio de cultivo WPM tiene efectos positivos en la formación de raíces (fase de enraizamiento) e influye de forma negativa la formación de nuevos brotes en las primeras fases de la micropropagación.

En relación a la influencia del tipo de auxinas con adición de AIB en el medio de cultivo WPM se logró constatar que el porcentaje de contaminación a los 8, 15, 22 y 29 días no existieron diferencias estadísticas significativas entre las diferentes concentraciones de AIB en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de arándanos. Por otra parte, cuando no se añadió AIB se incrementó el porcentaje de establecimiento *in vitro* de los segmentos nodales de *V. corymbosum* (Figura 7 y Tabla 16)

Tabla 16. Influencia de diferentes concentraciones de Ácido Indol butírico (AIB) sobre el porcentaje de contaminación y el porcentaje de establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de plantas de arándanos (*V. corymbosum*) Var. Biloxi del banco de plantas donante de la FCAGP-UTA a los 8, 15, 22 y 29 días.

CONCENTRACIONES DE ÁCIDO INDOL BUTÍRICO (AIB)				
TRATAMIENTOS	Porcentaje de contaminación a los 8, 15, 22 y 29 días		Porcentaje de establecimiento a los 8, 15, 22 y 29 días	
	Rango promedio	Medias \bar{X}	Rango promedio	Medias \bar{X}
AIB 100 ppm	15,50 a	0	13,00 b	0
AIB 150 ppm	15,50 a	0	13,00 b	0
AIB 200 ppm	15,50 a	0	13,00 b	0
AIB 250 ppm	15,50 a	0	13,00 b	0
AIB 300 ppm	15,50 a	0	13,00 b	0
Control	15,50 a	0	28,00 a	100

Elaborado por: Viviana Toapanta

Rangos promedios que en una misma columna tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n=5$.

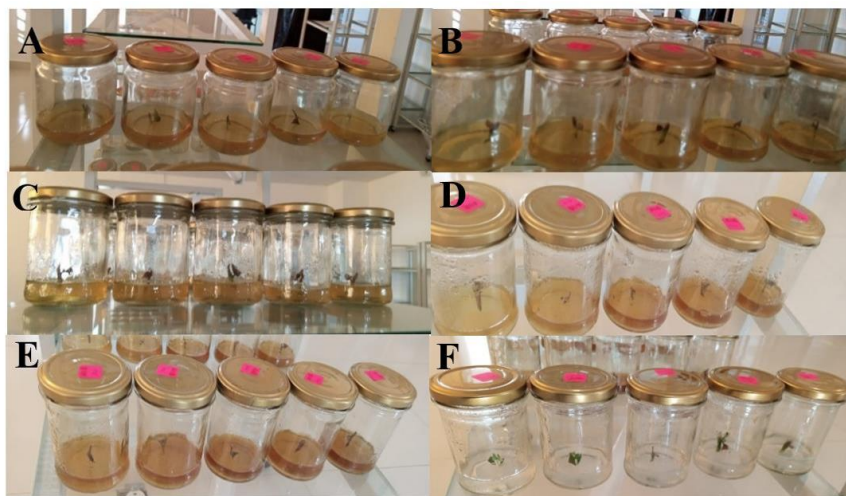


Figura 6. Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales con diferentes concentraciones de auxinas AIB 300 ppm (A), 400 ppm (B), 500 ppm (C), 600 ppm (D), 700 ppm (E), Control (F).

Según (Castro & Álvarez, 2013) en su investigación desarrollaron un protocolo de micropropagación mediante la proliferación de brotes axilares de mortiño (*Vaccinium meridionale* Sw.) en la fase de proliferación utilizaron 5 mg/l de 2-iP produciendo baja cantidad de yemas por explante y en la fase de enraizamiento adicionaron al medio AIB obteniendo 82.7 % de supervivencia de brotes y con mayor cantidad de yemas por explante.

Sin embargo, en otros cultivos (Uribe et al., 2012) mencionaron que al utilizar ANA y AIB en diferentes concentraciones en la fase de enraizamiento *in vitro* de microtallos de *N. glauca* establecidos en el medio MS. Los resultados que obtuvieron fueron de la supervivencia de 100% con la adición de 3 mg/l de AIB al medio de cultivo. En esta investigación mencionaron que la utilización de auxinas para la formación de raíces influyó de forma positiva para la formación de raíces *in vitro* y *ex vitro*.

Con este resultado se demostró que la concentración de AIB en bajas concentraciones evita la oxidación de explantes *in vitro* además que según lo mencionado por los autores la utilización de AIB tiene efectos positivos en la formación de raíces y con los resultados obtenidos en la investigación realizada se comprobó que en la fase de micropropagación inicial no fue útil su utilización porque no ayudo a la formación brotes que posteriormente

se oxidaron además en los frascos utilizados el medio de cultivo suplementado con AIB cambio de color blanco a café amarillento a los 15 días de haber sido establecidos a diferencia del testigo que presento 100% de establecimiento y el tono del medio no cambio en ningún momento.

3.2.2. Influencia del tipo de citoquininas y sus concentraciones en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de arándanos (*V. corymbosum*) variedad Biloxi.

En relación a la influencia del tipo de citoquinina con diferentes concentraciones en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de arándano se logró observar que existieron diferencias estadísticas significativas, en el tratamiento sin auxinas (Control) se obtuvo un mayor porcentaje de establecimiento *in vitro*. El mayor porcentaje de contaminación se registró cuando se utilizó 0,05 mg/L de TDZ (**Figura 7 y Tabla 17**).

Tabla 17. Influencia de diferentes concentraciones de THIDIAZURON (TDZ) sobre el porcentaje de contaminación y el porcentaje de establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de plantas de arándanos (*V. corymbosum*) Var. Biloxi del banco de plantas donante de la FCAGP-UTA a los 8, 15, 22 y 29 días.

TRATAMIENTOS	THIDIAZURON (TDZ)			
	Porcentaje de contaminación a los 8, 15, 22 y 29 días		Porcentaje de establecimiento a los 8, 15, 22 y 29 días	
	Rango promedio	Medias \bar{X}	Rango promedio	Medias \bar{X}
0,01 mg	15,00 b	0	13,00 b	100
0,05 mg	18,00 a	20	16,00 a	100
0,1 mg	15,00 b	0	16,00 a	100
1,0 mg	15,00 b	0	16,00 a	100
1,5 mg	15,00 b	0	16,00 a	100
Control	15,00 b	0	16,00 a	100

Elaborado por: Viviana Toapanta

Rangos promedios que en una misma columna tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n=5$.

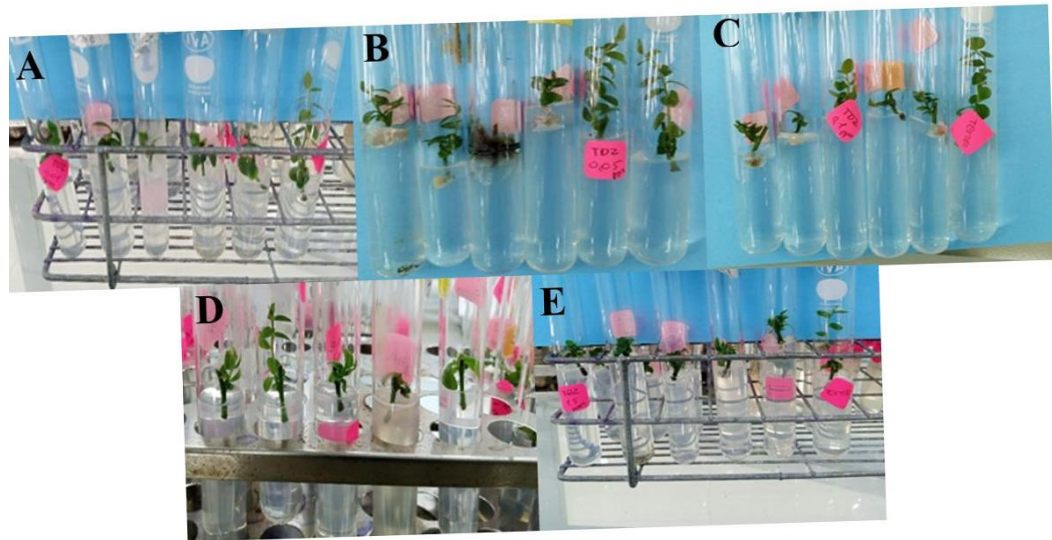


Figura 7. Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales con diferentes concentraciones de citoquininas Thidiazuron 0,01ppm (A), 0,05 ppm (B), 0,1 ppm (C), 1,0 ppm (D), 1,5 ppm (E).

Hruskoci & Read, 1993 mencionaron que desarrollaron un protocolo para regenerar brotes a partir de segmentos de tallos de arándanos, seleccionando los entrenudos más jóvenes la utilización de Thidiazuron estimulo la presencia de callos en los explantes y nuevos brotes adventicios. Otros estudios realizados en diferentes cultivos como lo menciona (**Peña et al., 2014**) que la utilización de Thidiazuron (TDZ) y 6-BAP para la inducción de brotes de Nogal (*Juglans neotropica* Diels) *in vitro* presentaron mayor número de brotes por explante. Además (**Pillco & Quezada, 2017**) mencionaron que la combinación de Thidiazuron en la propagación *in vitro* de segmentos foliares de frutilla presentó mejores resultados en la formación brotes.

Con los resultados obtenidos en esta investigación se demostró que la utilización del Thidiazuron en la atapa de establecimiento *in vitro* de arándano y de otras variedades ayuda a la activación de nuevos brotes, los explantes evaluados con diferentes concentraciones de Thidiazuron presentaron supervivencia del 100% siendo superior a los demás tratamientos evaluados anteriormente en esta investigación.

En relación a la influencia del tipo de citoquinina con diferentes concentraciones en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de arándano se logró observar que no existieron diferencias estadísticas significativas, tanto para el porcentaje de contaminación y porcentaje de establecimiento presentaron los mismos resultados de igual manera que los explantes que no fueron adicionados con 2-AiP (**Figura 8 y Tabla 18**).

Tabla 18. Influencia de diferentes concentraciones de 2-iP sobre el porcentaje de contaminación y el porcentaje de establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de plantas de arándanos (*V. corymbosum*) Var. Biloxi del banco de plantas donante de la FCAGP-UTA a los 8, 15, 22 y 29 días.

TRATAMIENTOS	2-iP			
	Porcentaje de contaminación a los 8, 15, 22 y 29 días		Porcentaje de establecimiento a los 8, 15, 22 y 29 días	
	Rango promedio	Medias \bar{X}	Rango promedio	Medias \bar{X}
2-iP 2 ppm	15,50 a	0	15,50 a	100
2-iP 3 ppm	15,50 a	0	15,50 a	100
2-iP 4 ppm	15,50 a	0	15,50 a	100
2-iP 5 ppm	15,50 a	0	15,50 a	100
2-iP 6 ppm	15,50 a	0	15,50 a	100
Control	15,50 a	0	15,50 a	100

Elaborado por: Viviana Toapanta

Rangos promedios que en una misma columna tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n=6$.

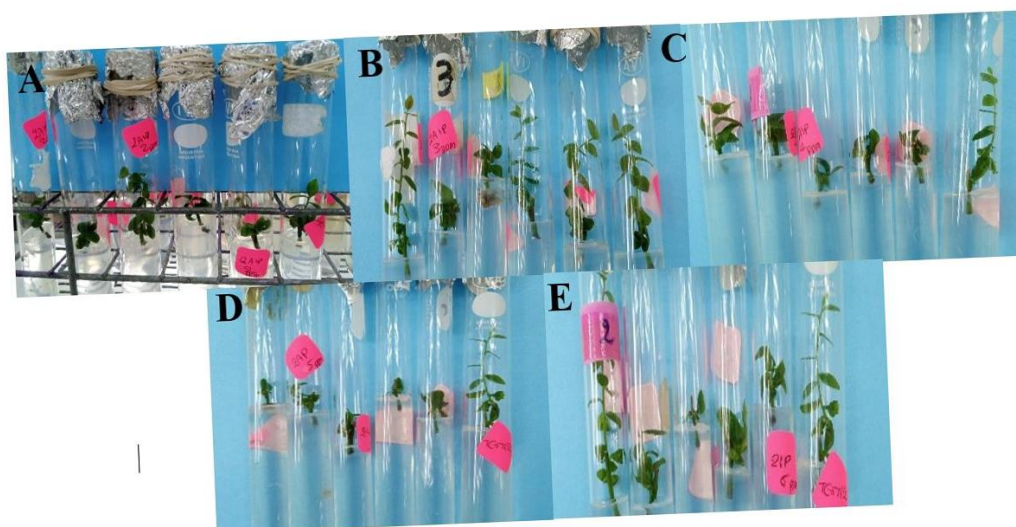


Figura 8. Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales en diferentes concentraciones de citoquininas 2AiP 2ppm (A), 3 ppm (B), 4 ppm (C), 5 ppm (D), 6 ppm (E).

Según (**Rache y Pacheco. 2010**) mencionaron que los brotes nodales establecidos *in vitro* de *Vaccinium meridionale* en el medio WPM suplementado con 2-iP presentaron resultados positivos en cuanto al tamaño de sus brotes. Además (**Chamorro et al., 2007**) mencionaron que los explantes de arándano suplementados con concentraciones elevadas de 2-iP y Thidiazuron reducen la proliferación de brotes de (*Curcuma longa* L.).

Sin embargo (**Tapia y Retamales. 2009**) mencionaron que en la atapa de establecimiento con la utilización del medio WPM suplementado con 2-iP la presencia de explantes oxidados dependió de la concentración muy elevadas con las que se trabajó caso contrario lo que sucedió en concentraciones bajas los resultados cambiaron de forma positiva ayudando a la formación de brotes nuevos.

Con los resultados obtenidos en esta investigación se comprobó que la utilización de 2-iP en concentraciones bajas ayudo a la proliferación de brotes como lo menciono **Tapia y Retamales. 2009**, los mejores resultados obtenidos fueron con dosis de 3ppm de 2-iP con brotes más grandes y mayor cantidad de hojas por explante sin embrago las demás concentraciones evaluadas presentaron 100% de supervivencia, pero el tamaño de los brotes fue inferior al tamaño de 3 ppm de 2-iP.

3.2.3. Influencia de condiciones de luminosidad en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de arándanos (*V. corymbosum*) variedad Biloxi.

En relación a la influencia de condiciones de luminosidad en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de arándano se logró observar que existieron diferencias estadísticas significativas los mejores resultados fueron los explantes que estuvieron en luz blanca fluorescente con un tamaño de 4 cm de longitud a diferencia de los demás tratamientos evaluados que presentaron brotes pequeños (**Figura 10 y Tabla 20**).

Tabla 19. Influencia del tipo de luminosidad sobre el porcentaje de contaminación y el porcentaje de establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de plantas de arándanos (*V. corymbosum*) Var. Biloxi del banco de plantas donante de la FCAGP-UTA a los 8, 15, 22 y 29 días.

TRATAMIENTOS	LUMINOSIDAD			
	Porcentaje de contaminación a los 8, 15, 22 y 29 días		Porcentaje de establecimiento a los 8, 15, 22 y 29 días	
	Rango promedio	Medias \bar{X}	Rango promedio	Medias \bar{X}
Oscuridad	12,00 b	0	15,00 a	100
Luz blanca fluorescente	12,00 b	0	15,00 a	100
Fotoperiodo 1 (24 h luz blanca fluorescente / 24 h oscuridad)	14,50 a	20	15,00 a	100
Fotoperiodo 2 (24 h luz natural / 24 h oscuridad)	12,00 b	0	10,00 b	60
Luz natural	14,50 a	20	10,00 b	60

Elaborado por: Viviana Toapanta

Rangos promedios que en una misma columna tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n=5$.

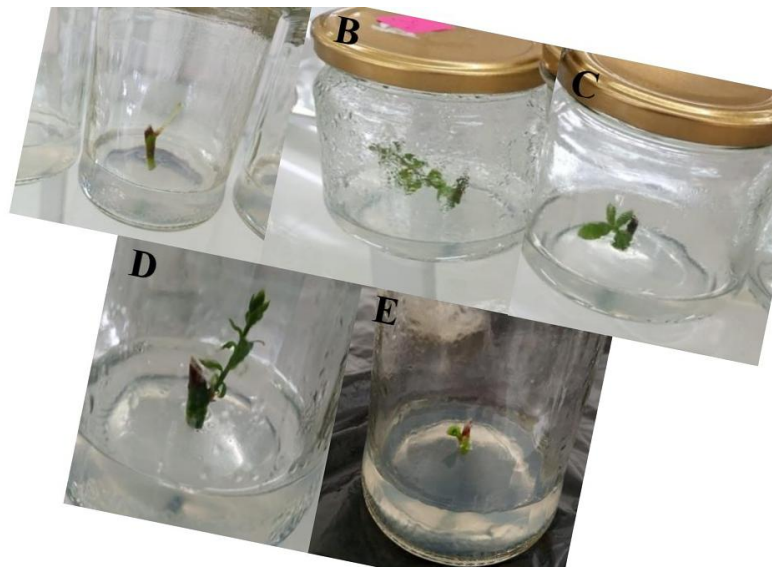


Figura 9. Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales con diferentes condiciones de iluminación oscuridad (A), luz blanca fluorescente (B), luz natural (C), fotoperíodo 1 (24 h luz blanca fluorescente /24 h oscuridad) y fotoperíodo 2 (24 h luz natural /24 h oscuridad)

Según (Cappai et al., 2012), evaluaron el efecto de las luces LED blancas fluorescentes en explantes *in vitro* de arándano (*V. Corymbosum*) obteniendo como resultados que los explantes expuestos a lámparas con luz LED blanca influyen en la producción de meristemas y biomasa a diferencia de explantes que fueron expuestos a la luz natural mencionando que la luz puede considerarse como un regulador de crecimiento que afecta directamente al crecimiento de las plantas.

Sin embargo, estudios realizados en otras variedades como lo menciona (Pérez et al. 2012) quienes evaluaron la multiplicación de embriones somáticos de Soya bajo condiciones de luz artificial y luz natural obtuvieron los mejores resultados con los embriones expuestos a luz blanca artificial. De igual manera (Fajardo. 2006) menciono que los explantes de arándano *in vitro* expuestos a condiciones de luz blanca fluorescente fueron los que mayor porcentaje de brotes presentaron a diferencia de los explantes que fueron sometidos a condiciones de oscuridad debido a crecimiento de los brotes fue lento.

Con los resultados obtenidos en el ensayo realizado se observó que los explantes sembrados en el medio de cultivo *in vitro* expuestos a la luz blanca fluorescente fue el tratamiento que mejor resultados presento a diferencia de los demás tratamientos evaluados las principales diferencias entre ellos fueron el tamaño de sus brotes de igual manera el número de hojas por explante fue inferior al tratamiento evaluado bajo luz blanca fluorescente, sin embargo los explantes que fueron expuestos a condiciones de oscuridad por los 29 días de evaluación presentaron diferencias en su coloración y el tamaño del explante.

3.2.4. Influencia del antioxidante en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de arándanos (*V. corymbosum*) variedad Biloxi.

Con la adición al medio de cultivo WPM de cisteína y ácido cítrico se logró un mayor porcentaje de establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *V. corymbosum* a los 29 días. En el resto de los tratamientos evaluados no se apreciaron diferencias (**Figura 9 y Tabla 19**).

Tabla 20. Influencia del tipo de antioxidante sobre el porcentaje de contaminación y el porcentaje de establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de plantas de arándanos (*V. corymbosum*) Var. Biloxi del banco de plantas donante de la FCAGP-UTA a los 8, 15, 22 y 29 días.

TRATAMIENTOS	TIPO DE ANTIOXIDANTE							
	Porcentaje de contaminación a los 8, 15 y 22 días		Porcentaje de establecimiento a los 8, 15 y 22 días		Porcentaje de contaminación a los 29 días		Porcentaje de establecimiento a los 29 días	
	Rango promedio	Medias \bar{X}	Rango promedio	Medias \bar{X}	Rango promedio	Medias \bar{X}	Rango promedio	Medias \bar{X}
Cisteína	11 a	0	11 a	0	11 a	0	14,50 a	100
Ácido cítrico	11 a	0	11 a	0	11 a	0	14,50 a	100
Ácido ascórbico	11 a	0	11 a	0	11 a	0	4 b	0

Elaborado por: Viviana Toapanta

Rangos promedios que en una misma columna tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n=7$.



Figura 10. Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales con diferentes tipos de antioxidantes ácido cítrico 0,05 g (A), cisteína 0,05 g (B), ácido ascórbico 0,05 g (C).

Según (Montes. 2012) mencionó que la utilización de ácido ascórbico para micropropagación de arándano resultó ser una buena alternativa para el control de oxidación de explantes en concentraciones de 0,125mg/L. Además, en la investigación que realizaron (Royero et al. 2007) mencionaron que observaron el oscurecimiento de los medios de cultivo, producto de la oxidación fenólica de los explantes, sin embargo, el éxito logrado en la fase de establecimiento sucedió porque los compuestos fenólicos fueron eliminados y neutralizados de manera eficiente con el uso de cisteína en el medio de cultivo.

Con los resultados obtenidos se observó que la utilización de ácido cítrico en el medio de cultivo fue el tratamiento que mejores resultados presentaron con brotes vigorosos de color verde intenso con 5 cm de longitud y 10 hojas por explante, sin embargo, el tratamiento que fue complementado con cisteína presentó brotes pequeños de 3 cm de longitud y 4 hojas por explante. Mientras que la utilización de ácido ascórbico en su primera semana de evaluación fue el tratamiento que mayor tamaño de brotes obtuvo al igual que hojas activas sin embargo a partir de las 3 semanas de evaluación presentó síntomas de necrosamiento ocasionando la muerte de todos los brotes hasta los 29 días de evaluación, con los resultados obtenidos se recomienda la utilización de ácido cítrico y cisteína como antioxidante en micropropagación de arándano.

3.3. Conformar un banco de plantas donantes con características juveniles

3.3.2. Influencia del tipo de frasco en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de arándanos (*V. corymbosum*) variedad Biloxi.

En relación a la influencia del tipo de frasco en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de arándano se observó que no existieron diferencias estadísticas significativas pues todos los tratamientos evaluados presentaron supervivencia del 100% de igual manera sucedió para el tamaño de brotes y el número de hojas activas (**Figura 11 y Tabla 21**).

Tabla 21. Influencia del tipo de frasco sobre el porcentaje de contaminación y el porcentaje de establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de plantas de arándanos (*V. corymbosum*) Var. Biloxi del banco de plantas donante de la FCAGP-UTA a los 8, 15, 22 y 29 días.

TRATAMIENTOS	TIPO DE FRASCO			
	Porcentaje de contaminación a los 8, 15, 22 y 29 días		Porcentaje de establecimiento a los 8, 15, 22 y 29 días	
	Rango promedio	Medias \bar{X}	Rango promedio	Medias \bar{X}
Tubos de ensayo	30,50 a	0	30,50 a	100
Envases de plástico	30,50 a	0	30,50 a	100
Envases de vidrio	30,50 a	0	30,50 a	100

Elaborado por: Viviana Toapanta

Rangos promedios que en una misma columna tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n=20$.

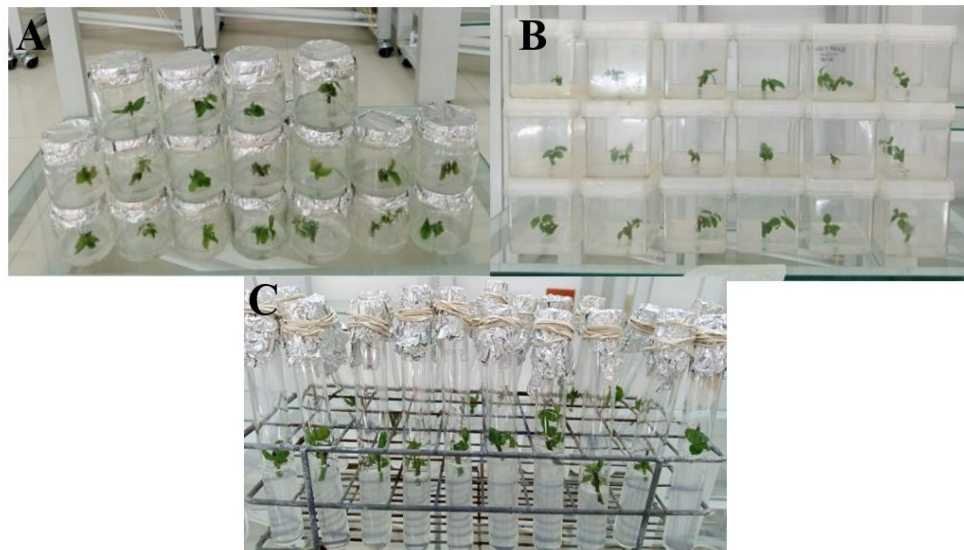


Figura 11. Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales en diferentes tipos de envases: frascos de vidrio (A), frascos de plástico (B) y tubos de ensayo de vidrio (C).

Según **(Cappai et al., 2012)** en su investigación mencionaron que el tipo de recipiente influye en la proliferación y calidad de brotes en la micropropagación de arándano (*V. corymbosum*) Blue Crop al final de su investigación obtuvieron mejores resultados con frascos de 720 ml con tapas metálicas ventilados con filtros de esponja antimicrobianos ya que los brotes de los explantes fueron vigorosos de color verde intenso a diferencia de los explantes evaluados en frascos sin tapa y cubiertos con parafilm. Además **(Rodríguez et al. 2005)** señalaron que el tipo de frascos que se utilice en el establecimiento *in vitro* ayuda en la fase de alargamiento del explante señalando que los tubos de ensayo al igual que frascos de 250 ml son ideales para el establecimiento *in vitro*.

Sin embargo **(Ramírez et al. 2002)** mencionaron que para lograr el éxito en el proceso de la micropropagación *in vitro* se debe tomar en cuenta varios aspectos entre el más importante el tipo de frasco, los frascos de vidrio que utilizó para su investigación debían pasar por el proceso de esterilización para evitar la contaminación del medio y del explante de igual manera utilizaron frascos de plástico que al momento de pasar por el proceso de autoclavado para su esterilización algunos frascos salieron deformes debido a las temperaturas que fueron sometidos mencionando que la selección de los frascos a utilizar dependerá mucho del éxito del ensayo.

Con los resultados obtenidos en esta investigación se comprobó que los frascos de vidrio y los tubos de ensayo para micropropagación de arándano *in vitro* son los que mejores resultados presentaron con 100% de establecimiento y 0% de contaminación a diferencia de los envases de vidrio que por exponerse a temperaturas muy elevadas en el proceso de esterilización presentaron ligeras deformidades en las tapas siendo dificultoso cerrarlos al momento de la siembra de los explantes con estas observaciones se recomienda la utilización de frascos de vidrio para la micropropagación de arándano.

3.3.3. Influencia del agente gelificante sobre las características juveniles de las plantas de arándanos (*V. corymbosum*) variedad Biloxi.

En relación con el tipo de agente gelificante utilizado no existieron diferencias estadísticas entre los tratamientos evaluados respecto al porcentaje de contaminación *in vitro*. Sin embargo, cuando se utilizó AGAR, así como Phytigel se incrementó el porcentaje de establecimiento *in vitro* de los segmentos nodales de arándano (**Figura 12 y Tabla 22**).

Tabla 22. Influencia del tipo de agente gelificante sobre el porcentaje de contaminación y el porcentaje de establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de plantas de arándanos (*V. corymbosum*) Var. Biloxi del banco de plantas donante de la FCAGP-UTA a los 8, 15, 22 y 29 días.

AGENTE GELIFICANTE				
TRATAMIENTOS	Porcentaje de contaminación a los 8, 15, 22 y 29 días		Porcentaje de establecimiento a los 8, 15, 22 y 29 días	
	Rango promedio	Medias \bar{X}	Rango promedio	Medias \bar{X}
MacConkey agar	8,00 a	0	3,00 b	0
Phytigel	8,00 a	0	10,50 a	100
Agar	8,00 a	0	10,50 a	100

Elaborado por: Viviana Toapanta

Rangos promedios que en una misma columna tengan letras no comunes, difieren según la prueba de Kruskal Wallis, complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$ con $n=5$.

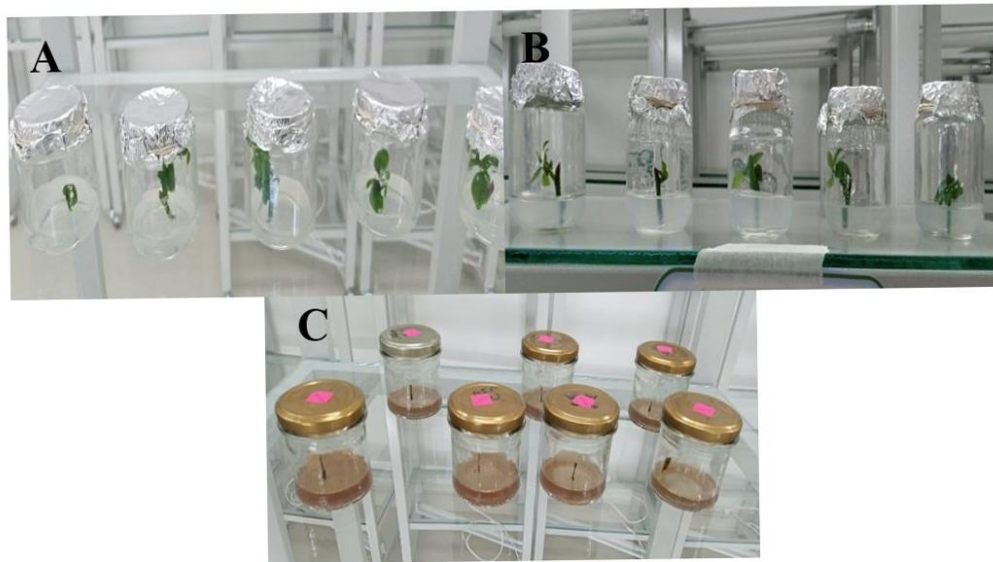


Figura 12. Establecimiento *in vitro* de segmentos nodales con diferentes tipos de agentes gelificantes Agar (A), Phytigel (B) y Makonkey agar (C).

Leiva & Toapanta, 2021 mencionaron que en su investigación realizada con el uso de Phytigel para establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de arándano a diferentes concentraciones no presentaron diferencias entre los tratamientos evaluados tanto para el porcentaje de contaminación y para la variable vigor de los segmentos nodales en un tiempo de 42 días de evaluación. Además (**Brenes Angulo et al., 2015**) mencionaron que al utilizar 2 g/L de Phytigel para la preparación de medios de cultivo en micropropagación de segmentos nodales de arándano se obtuvo porcentajes significativos en el establecimiento *in vitro*.

Sin embargo (**Novisel et al. 2012**) mencionaron que el Agar es el agente gelificante más utilizado en la preparación de medios de cultivo para micropropagación *in vitro* porque contiene propiedades como estabilidad, claridad y resistencia al metabolismo durante todo el proceso de micropropagación. Estudios realizados en banano como lo mencionan (**Aguilar et al. 2002**) señalaron que la utilización de Phytigel en el medio de cultivo suplementado con 6-BAP presentó los mejores resultados en la formación de número de brotes de banano FHIA-01 (AAAB).

Con los resultados obtenidos en esta investigación se constató que la utilización del agente gelificante tanto como agar y Phytigel presentaron los mejores resultados tanto en el porcentaje de establecimiento con 100% y 0% de contaminación de los explantes *in vitro* caso contrario lo que sucedió con el uso de MacConkey agar todos los explantes se oxidaron, pero no hubo presencia de contaminación de los mismos.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES

1. Para el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *V. corymbosum* no influyo la consistencia del medio de cultivo.
2. Los explantes provenientes del banco de plantas donantes de la FCAGP asi como bajo condiciones de invernadero fueron los que mayor porcentaje de establecimiento *in vitro* lograron.
3. Las frecuencias de subcultivo utilizadas no influyeron ni en el porcentaje de establecimiento *in vitro* ni en el porcentaje de contaminación de los segmentos nodales de *V. corymbosum*.
4. La aplicación de ANA, AIA y AIB no tuvieron efecto alguno en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *V. corymbosum*.
5. Las citoquininas TDZ y 2iP no mostraron influencia en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *V. corymbosum*.
6. Al utilizar cisteína y ácido cítrico se alcanzó un 100% de establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *V. corymbosum*.
7. Al utilizar oscuridad, luz blanca fluorescente continua y fotoperíodo compuesto por 24 horas luz blanca fluorescente / 24 horas oscuridad se alcanzaron los mejores porcentajes de establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *V. corymbosum*.
8. El tipo de frasco no influyo en el establecimiento *in vitro* ni en el porcentaje de contaminación de *in vitro* de segmentos nodales de *V. corymbosum*.
9. El uso de Agar y Phytigel garantiza un mayor porcentaje de establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *V. corymbosum*.

4.2. RECOMENDACIONES

1. Usar medio de cultivo líquido WPM en tubos de ensayo para optimizar espacio en cámaras de cultivo.
2. Tomar segmentos nodales de *V. corymbosum* procedentes del banco de plantas donantes de la FCAGP.
3. Probar frecuencias de subcultivo superior a 30 días.
4. No utilizar auxinas ni citoquininas para establecer segmentos nodales de *V. corymbosum* Var. Biloxi.
5. Suplementar el medio de cultivo WPM con cisteína y con ácido cítrico para prevenir la oxidación de los explantes de *V. corymbosum* e incrementar el porcentaje de establecimiento *in vitro*.
6. Utilizar la luz blanca fluorescente como fuente de iluminación en la fase de establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *V. corymbosum* Var. Biloxi.
7. Utilizar el agar como agente gelificante en el medio de cultivo WPM.

BIBLIOGRAFÍA

- Albany, N. R., Vilchez, J. A., León, S., Nava, A. R., Martínez, L. J., & Molina, M. A. (2015). Medios de cultivo líquidos: un avance para la micropropagación comercial de zábila (*Aloe barbadensis* Mill.). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(1), 24–31. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.50669>
- Álvaro Azofeifa. (2009, July). PROBLEMAS DE OXIDACIÓN Y OSCURECIMIENTO DE EXPLANTES CULTIVADOS IN VITRO. *Agronomía Mesoamericana*, Vol. 20, Núm. 1, 153–175.
- Andrade-Rodríguez, M., López-Peralta, M. C., González-Hernández, V. A., García-Velázquez, A., & Peña-Lomelí, A. (2005). EFECTO DEL GENOTIPO EN LA MICROPROPAGACIÓN DE TOMATE DE CÁSCARA. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 11, 31–37.
- Armijos, H., & González, M. (2021). *Estudio de la reproducción in vitro del (Vaccinium corymbosum L.) Variedad. biloxy, arándano considerando distintos medios de cultivos para su adaptación en la zona de Santo Domingo De Los Tsáchilas*. <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/25899/1/T-ESPESD-003133.pdf>
- Baldo, N., Yescas, A., & Morales, D. (2017). Manejo agronómico del cultivo de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) en la Sierra Norte de Oaxaca. *CIVITEC*, 6(1), 138–155. <https://revistas.unica.cu/index.php/uciencia/article/view/707/1127>

- Barker, W., & Collins, W. (2011). The blueberry rhizome: in vitro culture. *Canadian Journal of Botany*, 41(9), 1325–1329. <https://doi.org/10.1139/B63-113>
- Brenes, A., Castillo, R., & Gómez, L. (2015). Micropropagación de cuatro cultivares de arándano (*Vaccinium* spp.) a partir de segmentos foliares de dos procedencias. *Agronomía Costarricense*, 39(1), 7–12. <https://www.redalyc.org/pdf/436/43638524001.pdf>
- Cabezas-Gutiérrez, M., & Peña-Baracalado, F. (2011). Estimación del área foliar del arándano (*Vaccinium corymbosum*) por medio no destructivo. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 15(2), 373–379. <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v15n2/v15n2a15.pdf>
- Calzada, T. (2021). *Respuesta de citoquinina y auxina en la micropropagación in vitro de la fresa (Fragaria x ananassa Duch) cv. Aroma*. <https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/5064/calzada-pelaez-tiffany-pilar.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Campos Ruiz, J., Arteaga Cuba, M., Campos Ruiz, S., Chico Ruíz, J., Cerna Rebaza, L., Campos Ruiz, J., Arteaga Cuba, M., Campos Ruiz, S., Chico Ruíz, J., & Cerna Rebaza, L. (2020). Establecimiento de un protocolo de desinfección y micropropagación in vitro de “caoba”; *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae). *Arnaldoa*, 27(1), 141–156. <https://doi.org/10.22497/arnaldoa.271.27107>
- Cappai, F., Garcia, A., Cullen, R., Davis, M., & Munoz, P. R. (2012). Advancements in Low-Chill Blueberry *Vaccinium corymbosum* L. Tissue Culture Practices. *Plants*, 9(11), 1624. <https://doi.org/10.3390/plants9111624>

- Castro-Restrepo, D., & Álvarez-Guzmán, J. A. (2013). MICROPROPAGACIÓN CLONAL DE TRES GENOTIPOS MORTIÑO, VACCINIUM MERIDIONALE SW., POR PROLIFERACIÓN DE YEMAS AXILARES. *Actualidades Biológicas*, 35(99), 145–160. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-35842013000200002&lng=en&nrm=iso&tlng=
- Chamorro, A., Martínez, S., Fernández, J. C., & Mosquera, T. (2007). Evaluación de diferentes concentraciones de algunos reguladores de crecimiento en la multiplicación y enraizamiento in vitro de Limonium var. Misty blue. *Agronomía Colombiana*, 25(1), 47–53. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99652007000100006&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Daymí Ramírez Aguilar, Juan N. Pérez Ponce, Daniel Agramonte Peñalver, Felipe Jiménez Terry, Martha Pérez Peralta, & Odalys Gutiérrez Martínez. (2002). Estudio del comportamiento in vitro del cultivar de banano FHIA-01(AAAB) en la fase de multiplicación. *Biotecnología Vegetal*, 2(4), 227–233. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/192/168>
- Fajardo Lilien. (2006). *Establecimiento in vitro de yemas axilares de Guadua angustifolia* Kunt. <https://dspace.uclv.edu.cu/bitstream/handle/123456789/3490/2006.%20IBP.%20MSc.%20BV.%20%20Lilien%20Fajardo%20Rosabal.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Fan, S., Jian, D., Wei, X., Chen, J., Beeson, R. C., Zhou, Z., & Wang, X. (2017). Micropropagation of blueberry ‘Bluejay’ and ‘Pink Lemonade’

through in vitro shoot culture. *Scientia Horticulturae*, 226, 277–284.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.08.052>

- Galarza, J. (2019). *Estudio de factibilidad para la creación de la empresa “Arandeanblue”, productora y comercializadora de arándano, ubicada en el sector de Chaquibamba, provincia de Pichincha.* <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/20337/5/T-ESPE-038743.pdf>
- García, J. (2015). El cultivo de arándano en Asturias. *Tecnología Agroalimentaria*, 9(1), 13–20.
<https://ria.asturias.es/RIA/bitstream/123456789/1482/1/Archivo.pdf>
- García, J., García, G., & Ciordia, M. (2018). *El cultivo del arándano en el norte de España* (1st ed., Vol. 1). Asturgraf.
<http://www.serida.org/pdfs/7452.pdf>
- González, P. (2018, June 21). El arándano, un fruto de reciente producción en el país. *Líderes*, 1. <https://www.revistalideres.ec/lideres/arandano-fruto-reciente-produccion-ecuador.html>
- Hine, A., & Abdelnour, A. (2013). In vitro establishment of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L). *Tecnología En Marcha*, 26(4), 64–71.
- Hruskoci, J. D., & Read, P. E. (1993). IN VITRO SHOOT REGENERATION FROM INTERNODE SEGMENTS AND INTERNODE - DERIVED CALLUS OF BLUEBERRY (*VACCINIUM* SPP.). *Acta Horticulturae*, 346, 125–130.
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1993.346.17>

- Jiménez, F., & Agramonte, D. (2013). Cultivo in vitro y macropropagación como vía de sostenibilidad de la propagación de especies forestales. *Biotecnología Vegetal*, 13(1), 1–18. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/89>
- Jiménez, V., & Abdelnour, A. (2018). Protocolo de micropropagación de arándano nativo de Costa Rica (*Vaccinium consanguineum*). *Revista Tecnología En Marcha*, 31(1), 144–159. <https://doi.org/10.18845/TM.V31I1.3504>
- Jorge Liusvert Pérez Pérez, Teresa del Socorro Blanco Tirado, Lourdes García Rodríguez, Idalmis Bermúdez Caraballos, Novisel Veitía Rodríguez, & Raúl Collado. (2012). Influencia del tipo e intensidad de luz en la formación y multiplicación de embriones somáticos de soya. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752012000200015
- Leiva Michel, & Toapanta Andrea A. (2021). *Obtención de un banco de plantas donantes de arándanos (*Vaccinium corymbosum* L.) para el establecimiento in vitro de segmentos nodales en medio de cultivo semisólido*. Universidad Técnica de Ambato.
- Lerma, S., García, D., & Niño, W. (2019). Vista de Propagación in vitro de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) a partir de yemas axilares | Revista Siembra CBA. *Siembra CBA*, 2(1), 9–16. <http://revistas.sena.edu.co/index.php/Revsiembracba/article/view/3547/3992>

- Litwińczuk, W. (2013). Micropropagation of *Vaccinium* sp. by in vitro axillary shoot proliferation. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 11013(63), 63–76. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-074-8_5
- Liu, C., Callow, P., Rowland, L. J., Hancock, J. F., & Song, G. (2010). Adventitious shoot regeneration from leaf explants of southern highbush blueberry cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 103(1), 137–144. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9755-z>
- Marilyn Royero, Teresa Edith Vargas, & Maira Oropeza. (2007). MICROPROPAGACIÓN Y ORGANOGÉNESIS DE *Dioscorea alata* (ÑAME). *Red de Revistas Científicas de América Latina, El Caribe, España y Portugal*, 247–252.
- Márquez Janet, A., Herrera Victoria, C., Muñoz Verónica del Carmen, E., & Concha José, C. (2016). Funcionalidad del arándano azul (*Vaccinium corymbosum* L.). *Investigación y Desarrollo En Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(1), 423–428.
- Meléndez-Jácome, M. R., Flor-Romero, L. E., Sandoval-Pacheco, M. E., Vasquez-Castillo, W. A., & Racines-Oliva, M. A. (2021). *Vaccinium* spp.: Características cariotípicas y filogenéticas, composición nutricional, condiciones edafoclimáticas, factores bióticos y microorganismos benéficos en la rizosfera. *Scientia Agropecuaria*, 12(1), 109–120. <https://doi.org/10.17268/SCI.AGROPECU.2021.013>
- Montes de Godoy, M. E. (2012). Desarrollo de dos protocolos de micropropagación in vitro de las musáceas guineo manzano (musa AA) y dátil (musa AAB), de valor comercial y nostálgico para El Salvador, para su posterior incorporación en dos parcelas productivas. *Producción*

- Nin, S., Petrucci, W., Turchi, A., & Giordani, E. (2021). Adventitious rooting in stem and rhizome cuttings of Tuscan (Italy) *Vaccinium myrtillus* L. under different environmental conditions. *Journal of Berry Research*, 11(1), 69–87. <https://doi.org/10.3233/JBR-200597>
- Novisel Veitía, Raúl Collado, Lourdes R. García, Idalmis Bermúdez-Caraballos, Damaris Torre, Carlos Romero, & Autor para correspondencia. (2012). Influencia del agente gelificante en la regeneración de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. a partir de callos organogénicos. *Biotecnología Vegetal*, 12(3), 143–148. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/166/142>
- Núñez, A., Sánchez, E., Ruiz, J., & NeSmith, S. (2008). Agricultura Técnica en México. *Agricultura Técnica En México*, 34(4), 453–457. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=60811120008>
- Peña, D., Rocano, M., Salazar, J., & Torres, C. (2014). Inducción de la brotación in vitro de microplántulas de Nogal (*Juglans neotropica*) tratadas con Thidiazuron (TDZ) y 6-Bencilaminopurina (BAP). *MASKANA*, 5(2), 81–85. <https://doi.org/10.18537/mskn.05.02.07>
- Pillco Hilda, & Quezada Jorge. (2017). Efecto del tidiazuron y ácido indolbutírico en la propagación in vitro de dos variedades de frutilla (Oso Grande y Sweet Charlie) a partir de secciones foliares. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 8(1), 69–82. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2072-92942017000100005&lng=es&nrm=iso&tlng=es

- Rache Cardenal, L. Y., & Pacheco Maldonado, J. C. (2010). Propagación in vitro de plantas adultas de *Vaccinium meridionale* (Ericaceae). *Acta Botanica Brasilica*, 24(4), 1086–1095. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062010000400024>
- Ramírez Aguilar, D., Pérez Ponce, J. N., Agramonte Peñalver, D., Pérez Peralta, M., Gutiérrez Martínez, O., Jiménez Terry, F., & para correspondencia, A. (2002). Efecto de la utilización de nuevos frascos de cultivo en el proceso productivo de las biofábricas. In *Artículo científico Biotecnología vegetal* (Vol. 2, Issue 3).
- Ramos, J. (2012). *Avances de la micropropagación in vitro de plantas leñosas*. <https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/2515/17127974.pdf;jsessionid=D57AC1068B1AD38886C466BE5BBB374C.jvm1?sequence=1>
- Rivadeneira, M. F. (2012). Concentración de nutrientes en hojas de diferente estado de desarrollo en arándano. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 38(3), 247–250.
- Rodríguez, M., Chacón, M., & Carrillo, R. (2014). Efecto de la concentración y de los componentes del medio de cultivo MS sobre la germinación in vitro de *Ugni molinae*. *Bosque (Valdivia)*, 35(1), 119–122. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002014000100012>
- Rodríguez, M., & Morales, D. (2015). Efecto de la densidad de explantes y el volumen de medio de cultivo sobre la multiplicación in vitro de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) variedades Brigitta y Legacy . *Scientia*

- Ružić, D., Vujović, T., Cerović, R., Ostrolucka, M. G., & Gajdošova, A. (2012). Micropropagation in vitro of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Acta Horticulturae*, 926, 265–272. <https://doi.org/10.17660/ACTAHORTIC.2012.926.36>
- Salgado Vargas, C., Sánchez-García, P., Volke-Haller, V. H., & Colinas León, M. T. B. (2018). Respuesta agronómica de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) al estrés osmótico. *Agrociencia*, 52, 231–239.
- Samir, D. (2008). International Journal of Fruit Science Propagation of *Vaccinium* in Vitro. *International Journal of Fruit Science*, 6(2), 47–71. https://doi.org/10.1300/J492v06n02_04
- Tapia Salas, M. D. L. P., & Retamales Aranda, J. (2009). Evaluacion de metodos de micropropagación vegetativa de arandanos in vitro (*Vaccinium corymbosum*). *Universidad de Talca (Chile)*, 52. <http://dspace.otalca.cl/handle/1950/7383>
- Torres, C. (2015). *Manejo integrado de plagas y enfermedades del cultivo de arándano*. Science For A Better Life. <https://cdn.blueberriesconsulting.com/2016/12/manejo-integrado-enfermedades-arandano.pdf>
- Uribe, M. E., Ulloa, J., Delaveau, C., Sáez, K., Muñoz, F., & Cartes, P. (2012). Influencia de las auxinas sobre el enraizamiento in vitro de microtallos de *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser. *Gayana. Botánica*, 69(1), 105–112. <https://doi.org/10.4067/S0717-66432012000100010>

ANEXOS FERTILIZACIÓN DE ARÁNDANO

- Ing. Juan Yáñez
- Viviana Toapanta

PLANTAS DE ARÁNDANO SIN FERTILIZACIÓN EDÁFICA Y FOLIAR

PLANTAS GRANDES	PLANTAS MEDIANAS	PLANTAS PEQUEÑAS EN SUSTRATO TURBA 40% POMINA 20% FIBRA DE COCO 40%
		
<p>Observaciones: Plantas con hojas de color verde claro, baja presencia de frutos sus tallos son delgado sin presencia de nuevos brotes.</p>	<p>Observaciones Plantas pequeñas con hojas de color verde claro con bordes de color rojo, sus tallos son delgados sin presencia de brotes nuevos.</p>	<p>Observaciones plantas muy pequeñas con presencia de callos sin raíz y pequeños brotes.</p>

Elaborado por: Viviana Toapanta

PLANTAS PEQUEÑAS EN VASO

PLANTAS CON ANTERIOR SUSTRATO	OBSERVACIÓN	PLANTAS CON SUSTRATO TS 4	OBSERVACIÓN
	<p>Las plantas bebe se encontraban en un sustrato con un pH de 7.46 y con CE de 2.64 el cual no le permitia que la planta se desarrolle por esta razon cada semana habia un promedio de 5 platas muertas.</p>		<p>Con la adicción del nuevo sustrato TS4 en las 3 semanas que han trascurrido no hay presencia de plantas muertas sin embargo el color de las plantas se tornó verde claro debido al cambio de sustrato.</p>

Elaborado por: Viviana Toapanta

SUSTRATO ANTERIOR DE PLANTAS PEQUEÑAS

pH	CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA
	
pH= 7.46	CE= 2.64

Elaborado por: Viviana Toapanta


PREPARACION DE SOLUCIÓN

- Solución N=1


AGUA DE LLUVIA	AGUA LLAVE	RECOMENDADO
pH=6.9	pH=7.44	pH=5.5
CE=0.3	CE=0.5	CE=0.8-1.2

Elaborado por: Viviana Toapanta

- FÓRMULA AL 50%

TANQUE A					IMAGEN
FERTILIZANTE COMERCIAL	GRAMOS	LITROS	TOTAL, SOLUCIÓN	TOTAL, GRAMOS	
Nitromax	0,2gramos	Litro	20 litros	4 gramos	
Dazzani Inicial	0,07 gramos	Litro	20 litros	1,4 gramos	
Sulfato de magnesio	0,2 gramos	Litro	20 litros 0	4 gramos	

Elaborado por: Viviana Toapanta

TANQUE B					IMAGEN
Fertilizante comercial	Gramos	Litro	Total solución	Total gramos	
Calcio 24	0,2 gramos	Litros	20 litros	4 gramos	

Elaborado por: Viviana Toapanta




APLICACIÓN FOLIAR




1. Metalosato 2cc/lit * 1 vez a la semana

AGUA DE LLUVIA	SOLUCIÓN FINAL
Ph=6.9	pH=6.2
CE=0.3	CE= 0.42

Elaborado por: Viviana Toapanta

APLICACIONES EDÁFICAS Y FOLIARES

FECHA y DIA	TANQUE	LITROS	IMAGEN	OBSERVACIONES
MIÉRCOLES	Tanque A	10 litros Total, plantas 41 plantas <ul style="list-style-type: none"> • 3 grandes • 38 pequeñas 		Primera aplicación edáfica y foliar
VIERNES	Tanque B	10 litros Total, plantas 41 plantas <ul style="list-style-type: none"> • 3 grandes • 38 pequeñas 		Segunda aplicación edáfica
LUNES	Tanque A	10 litros Total, plantas 41 plantas <ul style="list-style-type: none"> • 3 grandes • 38 pequeñas 		Tercera aplicación edáfica en esta aplicación se puede observar a simple vista la presencia de nuevos brotes desde la base de las plantas y las plantas tienen color verde oscuro a diferencia de la primera y segunda aplicación.

MIERCOLES	<p>Tanque B 10 litros Total, plantas 41 plantas</p> <ul style="list-style-type: none"> • 3 grandes • 38 pequeñas 		<p>Cuarta aplicación edáfica y foliar en las plantas grandes se obtuvo frutos de arándanos de mayor tamaño con la presencia de brotes desde la base y florecimiento en sus brotes</p>
VIERNES	<p>Tanque A 10 litros Total, plantas 41 plantas</p> <ul style="list-style-type: none"> • 3 grandes • 38 pequeñas 		<p>Quinta aplicación edáfica</p> <p>Las plantas se adaptan a la fertilización de forma adecuada el cual las favorece para su correcto desarrollo.</p>
LUNES	<p>Tanque B 10 litros Total, plantas 41 plantas</p> <ul style="list-style-type: none"> • 3 grandes • 38 pequeñas 		<p>Sexta aplicación edáfica</p> <p>Las plantas se tornaron de color verde más oscuro con sus tallos un poco más gruesos y la altura de la planta es considerable.</p>

MIÉRCOLES

Tanque A 10 litros
Total, plantas 41
plantas

- 3 grandes
- 38 pequeñas



Séptima aplicación edáfica y foliar
Presencia de nuevos brotes desde la base como en los tallos principales
presencia de nuevas yemas.

Elaborado por: Viviana Toapanta

PH Y CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA

FECHA	PEQUEÑAS	MEDIANAS
Día 1	pH =5.55 CE=0.40	pH =5.55 CE=0.40
A los 7 días	pH =5.60 CE=0.55	pH=5.81 CE=0.55
A los 14 días	pH =6.02 CE=0.6	pH =7.05 CE=0.56

Elaborado por: Viviana Toapanta