



Evaluación del efecto de medios basales y diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, en la inducción de brotes y multiplicación *in vitro* de un cultivar de arándano alto del sur (*Vaccinium corymbosum* L.).

Romero Balladares, Nathaly Raquel

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Biotecnóloga

Raluca Mihai, Ph.D.

24 de febrero del 2023

Informe de originalidad

NOMBRE DEL CURSO

Revisión Tesis

NOMBRE DEL ALUMNO

NATHALY RAQUEL ROMERO BALLADARES

NOMBRE DEL ARCHIVO

NATHALY RAQUEL ROMERO BALLADARES - Trabajo de Titulación Estudiante

SE HA CREADO EL INFORME

27 feb 2023

Resumen

| | | |
|--------------------------------------|----|-------|
| Fragmentos marcados | 13 | 1 % |
| Fragmentos citados o entrecomillados | 1 | 0,1 % |

Raluca Alexandra Mihai

C.C.: 1757487507



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación: **“Evaluación del efecto de medios basales y diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, en la inducción de brotes y multiplicación *in vitro* de un cultivar de arándano alto del sur (*Vaccinium corymbosum* L.)”** fue realizado por la señorita **Romero Balladares Nathaly Raquel**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente

Sangolquí, 28 de febrero de 2023

Raluca Alexandra Mihai, Ph. D.

C.C.: 1757487507



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, Romero Balladares Nathaly Raquel, con cédula de ciudadanía n° 0923641260, declaro que el contenido, ideas y criterios del proyecto de integración curricular: "Evaluación del efecto de medios basales y diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, en la inducción de brotes y multiplicación *in vitro* de un cultivar de arándano alto del sur (*Vaccinium corymbosum* L.)" es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 28 de febrero de 2023



Romero Balladares Nathaly Raquel

C.C.: 0923641260



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, **Romero Balladares Nathaly Raquel**, con cédula de ciudadanía n° 0923641260, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el proyecto de integración curricular: **“Evaluación del efecto de medios basales y diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, en la inducción de brotes y multiplicación *in vitro* de un cultivar de arándano alto del sur (*Vaccinium corymbosum* L.)”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi/nuestra responsabilidad..

Sangolquí, 28 de febrero de 2023



Romero Balladares Nathaly Raquel

C.C.: 0923641260

Dedicatoria

“La imaginación es la facultad del descubrimiento, preeminentemente. Es lo que penetra en los mundos nunca vistos a nuestro alrededor, los mundos de la Ciencia.”

- *Ada Lovelace*

Dedico este trabajo a mis padres, Olga Balladares y Ernesto Romero, por todo el amor que siempre me han dado y por impulsarme a ser una mejor persona cada día.

A mis hermanos, por brindarme su apoyo moral y cariño. Espero ser un buen ejemplo para ustedes e inspirarlos a cumplir sus metas.

A mi mami Luz, quien en su vida me amó y siempre me dio la fortaleza de seguir adelante. Hubieras estado orgullosa de mí.

A mi Noa preciosa, que me dio su cariño incondicional y me cuidó durante esas noches largas de estudio.

Nathaly Raquel Romero Balladares

Agradecimientos

Quiero expresar mi gratitud a la empresa Conectiflor Andino S.A. que me brindó la oportunidad de poder desarrollar mi proyecto de titulación y me abrió sus puertas. En especial a Xavier Montalvo, quien me ha guiado con paciencia durante el desarrollo de este proyecto. También quiero expresar mi gratitud a Mayrita y Liz, quienes me han enseñado de su experiencia. Al personal administrativo, su directivo y al área del Breeding que hicieron más pintorescos mis días.

A Raluca Mihai, Ph. D. por ayudarme a cumplir mi proyecto de titulación y guiarme durante este proceso.

A mis maestros, quienes, gracias a su pasión a la enseñanza, han fomentado mi curiosidad y amor a la ciencia. Con su guía, conocimientos y paciencia me han inspirado a perseguir esta carrera.

A mis padres, Olga Balladares y Ernesto Romero, y hermanos, Josué y Alejandro, quienes aún en la distancia han hecho sentir su apoyo incondicional y amor. Gracias a ustedes he podido alcanzar uno de mis mayores logros y ser la persona que soy actualmente. Siempre han estado presentes en cada una de mis metas. Les estoy eternamente agradecida.

A toda mi familia, mis abuelos, en especial a mi mami Betty, quienes siempre me han dado su mano cuando he necesitado. Su cariño y apoyo me ha permitido continuar estudiando y salir adelante.

A mis amigos, Jonathan, Wendy, Adrián, Paul, Mateo y muchos más amigos que he formado a lo largo de estos años de estudio y han estado presentes en todo momento dándome su apoyo y guía cuando más lo necesitaba. A Haber, quienes me han visto crecer y me han acompañado desde el comienzo a alcanzar esta meta. Gracias por salvar mi salud mental y alegrarme siempre con sus ocurrencias. Les agradezco de todo corazón.

Nathaly Raquel Romero Balladares

Tabla de contenido

| | |
|--|----|
| Dedicatoria | 6 |
| Agradecimientos..... | 7 |
| Abreviaturas | 13 |
| Resumen..... | 14 |
| Abstract | 15 |
| Capítulo I: Introducción..... | 16 |
| Problema | 16 |
| Justificación del problema..... | 17 |
| Objetivos..... | 18 |
| Hipótesis..... | 18 |
| Capítulo II: Marco teórico..... | 19 |
| Arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.) | 19 |
| Cultivo de Tejidos Vegetales..... | 24 |
| Capítulo III: Metodología | 40 |
| Localización del proyecto y fuente de material vegetal..... | 40 |
| Evaluación del medio de cultivo para inducción de brotes | 40 |
| Fase de Multiplicación..... | 42 |
| <i>Primer Ensayo: Evaluación de medios basales con citoquininas</i> | 42 |
| <i>Segundo ensayo: Evaluación de IBA en medios de multiplicación</i> | 44 |
| Medio de cultivo | 44 |
| Condiciones de cultivo | 45 |
| Análisis estadístico | 45 |
| Capítulo IV: Resultados..... | 46 |
| Medio de cultivo para inducción de brotes | 46 |

| | |
|--|-----------|
| Fase de Multiplicación..... | 51 |
| <i>Primer ensayo: Evaluación de medios basales con citoquininas.....</i> | <i>51</i> |
| <i>Segundo ensayo: Evaluación la presencia de IBA en medios de multiplicación.....</i> | <i>60</i> |
| Capítulo V: Discusión | 65 |
| Medio de cultivo para inducción de brotes | 65 |
| Fase de Multiplicación..... | 66 |
| <i>Primer ensayo: Evaluación de medios basales con citoquininas.....</i> | <i>66</i> |
| <i>Segundo ensayo: Evaluación la presencia de IBA en medios de multiplicación.....</i> | <i>68</i> |
| Capítulo VI: Conclusiones | 69 |
| Capítulo VII: Recomendaciones | 70 |
| Bibliografía | 71 |

Índice de Tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1 <i>Clasificación taxonómica de Vaccinium corymbosum L.</i> | 20 |
| Tabla 2 <i>Composición de medios basales y sus concentraciones.</i> | 34 |
| Tabla 3 <i>Tratamientos de dos medios basales y las concentraciones de las dos citoquininas evaluadas en la fase de inducción a brotes.</i> | 41 |
| Tabla 4 <i>Tratamientos de dos medios basales y las concentraciones de las dos citoquininas evaluadas para los medios de multiplicación.</i> | 43 |
| Tabla 5 <i>Resumen de variables respuesta de los ensayos durante el cultivo en la etapa de inducción a brotes a las 5 semanas de cultivo.</i> | 50 |
| Tabla 6 <i>Resumen de las variables respuesta de los ensayos en la etapa de multiplicación a las 5 semanas de cultivo.</i> | 59 |
| Tabla 7 <i>Resumen de las variables respuesta en la para la etapa de multiplicación del segundo ensayo.</i> | 64 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1 <i>Ilustración de A) arándano rojo, B) arándano rojo, C) arándano rojo y D) arándano rojo del artista Arevka.</i> | 19 |
| Figura 2 <i>Ilustración científica de la morfología del arándano alto (Vaccinium corymbosum L.).</i> | 22 |
| Figura 3 <i>A) Brotes axilares (AX) y brotes adventicios (AD-M) junto a la base en V. corymbosum cv. "Herbert". B) Micropropagación y cultivo de meristemos.....</i> | 28 |
| Figura 4 <i>Esquema del proceso de micropropagación donde se destaca los métodos y principales etapas.</i> | 32 |
| Figura 5 <i>Relaciones de auxinas y citoquininas necesarias para el crecimiento y la morfogénesis.</i> | 38 |
| Figura 6 <i>Micro-estaca de Vaccinium corymbosum L. posterior a los tratamientos de desinfección dentro de la cámara de flujo laminar e inoculada en el medio de inducción de brotes.....</i> | 40 |
| Figura 7 <i>Evaluación de medios de cultivo para inducción de brotes a las 4 semanas de cultivo.</i> | 46 |
| Figura 8 <i>Longitud de los brotes según la composición del medio de cultivo en la etapa de inducción a brotes.....</i> | 47 |
| Figura 9 <i>Porcentaje de brotación según la composición del medio de cultivo en la etapa de inducción a brotes a las 5 semanas de cultivo.</i> | 48 |
| Figura 10 <i>Índice de multiplicación de los brotes según la composición del medio de cultivo en la etapa de inducción a brotes a las 5 semanas de cultivo.....</i> | 49 |
| Figura 11 <i>Explantos del ensayo de evaluación de medios basales con citoquininas a las 5 semanas del tratamiento.....</i> | 53 |
| Figura 12 <i>Longitud de los brotes según la composición del medio de cultivo en la etapa de multiplicación a las 5 semanas de cultivo.....</i> | 55 |

| | |
|---|----|
| Figura 13 <i>Brotación según la composición del medio de cultivo en la etapa de multiplicación a las 5 semanas de cultivo.</i> | 57 |
| Figura 14 <i>Índice de multiplicación de los brotes según la composición del medio de cultivo en la etapa de multiplicación a las 5 semanas de cultivo.</i> | 58 |
| Figura 15 <i>Explantos del ensayo de evaluación de medios basales con citoquininas a las 5 semanas del tratamiento.</i> | 60 |
| Figura 16 <i>Comparación entre las medias de la longitud de explantes entre los tratamientos con y sin IBA en la etapa de multiplicación a las 5 semanas de cultivo.</i> | 61 |
| Figura 17 <i>Comparación entre las medias de la brotación entre los tratamientos con y sin IBA en la etapa de multiplicación a las 5 semanas de cultivo</i> | 62 |
| Figura 18 <i>Comparación entre las medias del IM entre los tratamientos con y sin IBA en la etapa de multiplicación a las 5 semanas de cultivo.</i> | 64 |

Abreviaturas

2iP: 6-(γ,γ -Dimethylallylamino)purine

AN: Anderson Rhododendron Medium

ANA: ácido 1-naftalenacético o ácido naftalenacético

ANOVA: Análisis de la varianza o Analysis of Variance

cv.: Variedad o cultivar

IBA: ácido indol-3- butírico

IM: Índice de multiplicación

MB: Medio Basal

MS: Medio basal Murashige & Skoog

pH: Potencial de hidrógeno

WPM: Lloyd & McCown Woody Plant Basal Medium

ZEA: *trans*-zeatina

Resumen

Existe un creciente interés por el cultivo de variedades comerciales de *Vaccinium corymbosum* L. en Ecuador. La producción masiva de arándano ha incrementado la demanda del material de siembra de calidad, por lo que se ha optado en realizar su micropropagación. Sin embargo, la eficiencia de este método depende de la composición de su medio de cultivo. Por ello, se evaluó el efecto de los medios basales Lloyd & McCown Woody Plant Basal Medium (WPM) y Anderson Rhododendron Medium (AN) y diferentes reguladores de crecimiento en la inducción a brotes y la fase de multiplicación para la micropropagar un cultivar de arándano alto del sur. Los medios para la inducción de brotes contienen dos concentraciones de 2iP (2,5 mg/L y 5,0 mg/L) y ZEA (1,0 mg/L y 2,0 mg/L). Durante la fase de multiplicación *in vitro* se evaluaron tres concentraciones diferentes de 2iP (2,0 mg/L, 2,5 mg/L y 3,0 mg/L) y ZEA (1,0 mg/L, 2,0 mg/L y 3,0 mg/L), y posteriormente el efecto de 0,1 mg/L IBA en estos medios. Los resultados obtenidos demuestran que el tipo de citoquinina implementada tiene una influencia significativa en la inducción a brotes y en la fase de multiplicación. Se determinó que el medio WPM suplementado con 2 mg/L de ZEA es el óptimo con un porcentaje de brotación del 55,8%. También se evidencia que la interacción entre los medios basales, tipo de citoquininas y sus concentraciones, influyen significativamente en la iniciación de brotes axilares en segmentos nodales y la proliferación de brotes. En la fase de multiplicación, se determina que el mejor tratamiento es AN con 1mg/L de ZEA con índice de multiplicación de 1,63. En el segundo ensayo de la fase de multiplicación se observó que suplementar 0,1 mg/L IBA disminuye de manera significativa la eficiencia de los tratamientos. Añadir esta concentración de auxina causa un aumento en los síntomas de clorosis entre el 38,33 % y 69,12 % y disminuye la viabilidad de los explantes.

Palabras Clave: arándano alto, micropropagación, inducción a brotes, multiplicación

Abstract

There is a growing interest in the cultivation of commercial varieties of *Vaccinium corymbosum* L. in Ecuador. Mass production of blueberry has increased the demand for quality planting material, so it has been decided to carry out its micropropagation. However, the efficiency of this method depends on the composition of the culture medium. Therefore, the effect of Lloyd & McCown Woody Plant Basal Medium (WPM) and Anderson Rhododendron Medium (AN) and different growth regulators on shoot induction and multiplication phase was evaluated for micropropagation of a southern highbush blueberry cultivar. The media for shoot induction contained two concentrations of 2iP (2.5 mg/L and 5.0 mg/L) and ZEA (1.0 mg/L and 2.0 mg/L). During the in vitro multiplication phase, three different concentrations of 2iP (2.0 mg/L, 2.5 mg/L and 3.0 mg/L) and ZEA (1.0 mg/L, 2.0 mg/L and 3.0 mg/L) were evaluated, followed by the effect of 0.1 mg/L IBA on these media. The results obtained show that the type of cytokinin implemented has a significant influence on shoot induction and multiplication phase. The WPM medium supplemented with 2 mg/L ZEA was found to be the optimum medium with a sprouting percentage of 55.8%. It is also evident that the interaction between the basal media, type of cytokinins and their concentrations, significantly influence the initiation of axillary buds in nodal segments and shoot proliferation. In the multiplication phase, it was determined that the best treatment was AN with 1mg/L ZEA with multiplication index of 1.63. In the second multiplication phase trial, it was observed that supplementing 0.1 mg/L IBA significantly decreases the efficiency of the treatments. Adding this auxin concentration causes an increase in chlorosis symptoms between 38.33% and 69.12% and decreases explant viability.

Key words: Highbush blueberry, micropropagation, shoot induction, multiplication

Capítulo I: Introducción

Problema

Vaccinium corymbosum o arándano alto, es un arbusto perteneciente a la familia Ericaceas (Lerma et al., 2019). Los frutos de esta especie son bayas de color azul que tienen un alto valor nutricional y medicinal gracias a sus propiedades organolépticas y antioxidantes (Lerma et al., 2019) La demanda comercial e investigación científica en *Vaccinum* spp. Ha incrementado a nivel mundial (Edger et al., 2022). Esto ha convertido al fruto del arándano en un producto de gran interés económico (Hine & Abdelnour, 2013). Se ha señalado, que el consumo de este producto está creciendo un 20% anual en la última década (Edger et al., 2022).

El cultivo de arándano inició en Ecuador en 2015, gracias a un pequeño grupo de emprendedores que reconocieron el potencial ecuatoriano en este mercado. Las condiciones geográficas del país han permitido el desarrollo de este cultivo. En 2022, Ecuador inició la exportación de este producto hacia Países Bajos. Actualmente, existen aproximadamente 50 hectáreas dedicadas al cultivo de arándano, las cuales se encuentran en aumento gracias a los altos índices de rentabilidad y el aumento en la demanda del fruto (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2022).

La propagación de *Vaccinum corymbosum* se realiza tradicionalmente de manera vegetativa, sin embargo, este método no satisface las demandas para la producción masiva. Esto debido a la baja capacidad de enraizamiento de estacas de muchos genotipos o variedades, el tiempo requerido para la propagación masiva de nuevos cultivares, los problemas fitosanitarios y la desventaja de producir una progenie heteróloga. Por ello, se ha optado por la propagación *in vitro*, que garantiza la producción masiva del material de siembra élite, uniforme (Cao et al., 2003; Gajdošová et al., 2006; Jaakola et al., 2001) y libre de

enfermedades en corto tiempo (Jiménez-Bonilla & Abdelnour-Esquivel, 2018; Tejada et al., 2022).

La micropropagación de arándano ha sido ampliamente estudiada, sin embargo, los resultados han sido influenciados por factores como: el genotipo introducido, la composición del medio y reguladores de crecimiento usados (Tejada et al., 2022). De igual manera, se ha evidenciado que el tipo y la concentración de citoquinina o auxina, al igual que el medio basal, tienen un efecto significativo en el desarrollo del cultivo (Lambardi et al., 2013).

Justificación del problema

Existe un creciente interés por el cultivo de variedades comerciales de *Vaccinium corymbosum* en Ecuador. La producción masiva de arándano ha incrementado la demanda del material de siembra de calidad y libre de enfermedades. La propagación *in vitro* de las especies de *Vaccinium* ha comprobado ser efectiva para este propósito, ya que es un método rápido para obtener clones de élite y nuevos cultivares (Lambardi et al., 2013) de alta calidad y homogeneidad (Lerma et al., 2019).

Las especies *Vaccinium*, pueden reproducirse *in vitro* de manera eficiente mediante micro estacas o meristemas axilares (Undurraga & Vargas, 2013) sin embargo, su capacidad de regeneración en un medio *in vitro* es dependiente del genotipo (Castro, 2016). Por ello, se requiere evaluar los medios nutritivos en la inducción a brotes y la fase de multiplicación de explantes *in vitro* de un cultivar de arándano alto del sur (*Vaccinium corymbosum* L.) (Jiménez et al., 2020).

Objetivos

General:

- Evaluar el efecto de medios basales y diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, en la inducción de brotes y multiplicación *in vitro* de un cultivar de arándano alto del sur (*Vaccinium corymbosum* L.).

Específicos

- Evaluar el efecto de medios basales y diferentes citoquininas, en la inducción de brotes *in vitro* a partir de segmentos nodales de *Vaccinium corymbosum* L.
- Evaluar el efecto de medios basales y diferentes concentraciones de citoquininas, en el desarrollo y proliferación de brotes, durante la etapa de multiplicación *in vitro*.
- Evaluar el efecto del ácido 3-indol butírico (IBA) en la proliferación de brotes, durante la etapa de multiplicación *in vitro*.

Hipótesis

Los medios basales, complementados con las óptimas concentraciones de reguladores de crecimiento, permiten inducir la brotación y promueven la proliferación *in vitro* de la variedad de arándano alto del sur (*Vaccinium corymbosum* L.).

Capítulo II: Marco teórico

Arándano (*Vaccinium corymbosum* L.)

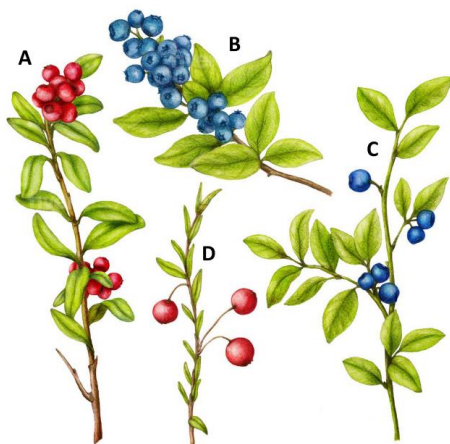
Distribución botánica y taxonomía

El género *Vaccinium* comprende los subgéneros *Oxycoccus* y *Cyanococcus*. El género *Vaccinium*, proveniente de la familia Ericáceas, la cual comprende más de 450 especies (Meléndez-Jácome et al., 2021; Padmanabhan et al., 2015) que crecen en áreas templadas. Las especies cultivables de *Vaccinium* se originaron en el hemisferio Norte (Britannica, 2023), mientras las especies silvestres puede encontrarse en el neotrópico y en los Andes de Sudamérica.

El arándano “blueberry” es una de las bayas más populares del género *Vaccinium* y del subgénero *Cyanococcus*. Las principales especies cultivables son: *V. myrtillus* L., *V. macrocarpon* Aiton, *V. vitis-idaea* L., el arándano ojo de conejo (*V. virgatum* Aiton [sinónimo = *V. ashei*]), el arándano bajo (*V. angustifolium* Aiton) y el arándano alto *V. corymbosum* L. (Figura 1) (Edger et al., 2022).

Figura 1

Ilustración de A) arándano rojo, B) arándano rojo, C) arándano rojo y D) arándano rojo del artista Arevka.



Nota: Recuperado de Edger, et al. (2022). There and back again; historical perspective and future directions for *Vaccinium* breeding and research studies. *Horticulture Research*,

Desde 1900, *V. corymbosum* L. comenzó a ser domesticada en Canadá y Estados Unidos (Lerma et al., 2019). Es un arbusto frutal perenne, productivo y auto fértil que miden aproximadamente 1,8 metros de alto. *V. corymbosum* comprende el 90% del genotipo de los cultivares altos del norte (Edger et al., 2022) y forman gran parte del genotipo de las variedades de arándano alto del sur. (Almanac, 2023; PROAIN, 2020)

Tabla 1

Clasificación taxonómica de Vaccinium corymbosum L.

| Orden | Descripción |
|---------------|--|
| Kingdom | Plantae – plantas, Planta, Vegetal, plants |
| Subkingdom | Viridiplantae – green plants |
| Infrakingdom | Streptophyta – land plants |
| Superdivision | Embryophyta |
| Division | Tracheophyta – vascular plants, tracheophytes |
| Subdivision | Spermatophytina – spermatophytes, seed plants, phanérogames |
| Class | Magnoliopsida |
| Superorder | Asteranae |
| Order | Ericales |
| Family | <i>Ericaceae</i> – heaths, éricacées |
| Genus | <i>Vaccinium</i> L. – blueberries, huckleberry, blueberry |
| Species | <i>Vaccinium corymbosum</i> L. – highbush blueberry, New Jersey blueberry, Southern blueberry, smallflower blueberry |

Nota: Recuperado de la base de datos en línea del Sistema Integrado de Información

Taxonómica (ITIS), www.itis.gov, CC0, <https://doi.org/10.5066/F7KH0KBK>

Morfología

La especie *Vaccinium* son arbustos deciduos erectos, que pueden medir hasta 2,5 m de altura, aunque con altura variable según la especie (Kwantlen Polytechnic University, 2015). Se propaga tradicionalmente mediante estacas. *V. corymbosum* o arándano alto, se originó en Norte América.

Sus hojas son simples, con forma elíptico-lanceoladas, con márgenes enteros o serrados y de peciolo corto. Tienen una forma simple, de manera alternada y de color verde. En otoño estas hojas adquieren tonalidades rojizas o amarillas.

Presenta inflorescencias en racimos de seis a diez flores por yema. Las flores tienen un tamaño de 1,0 cm y se distribuyen en racimos axilares. Tienen una corola blanca formada de cuatro a cinco pétalos fusionados de forma acampanada. Se presencia un pistilo simple y de ocho a diez estambres (Figura 2).

Las raíces del arándano son finas, fibrosas, sin pelos absorbentes y con poca profundidad. Gracias a estas características su sistema radicular es ineficiente en la absorción de nutrientes y agua (InfoAgro, 2023; Kwantlen Polytechnic, 2015).

El fruto es una baya esférica de color azul o negro y comestible. Los frutos crecen en racimos y contienen cincuenta semillas en su mesocarpio. Estas bayas están cubiertas de una cera que recubre toda la epidermis. Además, puede tener diferentes coloraciones dependiendo de su etapa de desarrollo: verde (inmaduro), rojo y azul (maduro) (Padmanabhan et al., 2015) Se recogen los frutos durante julio y agosto.

La baya del arándano ha ganado gran importancia gracias a sus propiedades organolépticas y nutritivas. Estos frutos son ricos en vitaminas, polifenoles, como antocianinas, flavonoides, ácidos fenólicos y carotenoides, los cuales tienen actividad antiinflamatoria. Además, se ha encontrado que su alto contenido de antocianinas permite prevenir algunas enfermedades crónicas como enfermedades neurodegenerativas, cardíacas o incluso diabetes (Schuchovski & Biasi, 2019; Tundis et al., 2021).

Figura 2

Ilustración científica de la morfología del arándano alto (*Vaccinium corymbosum* L.).



Nota: Recuperado de Britton, N., & Brown, A. (1913). An illustrated flora of the northern United States, Canada and the British possessions. In *An illustrated flora of the northern United States, Canada and the British possessions* (2nd ed., p. 675). C. Scribner's sons.

Requerimientos edafoclimáticos

El cultivo de arándano es actualmente uno de los cultivos más rentables del mercado y demanda de cuidados especiales. La producción requiere de considerar factores que influyen en el cultivo, en especial las condiciones edafoclimáticas y la variedad a usar.

Clima. Las especies de *Vaccinium* prefieren los climas templados o moderados en dependencia de la variedad. El arándano debe cumplir su periodo invernal y posteriormente, se vuelve sensible a bajas temperaturas. La temporada calurosa repercute en la producción del cultivo y reducir la calidad de la baya. Otro factor que influye en la producción es el viento, que puede ocasionar brotes caídos, pérdida de flores y puede impedir la polinización.

Las variedades híbridas de arándano alto del sur requieren de 200 a 600 horas bajo 7°C. Esto ha permitido producir este cultivar en zonas cálidas (PROAIN, 2020) .

Suelo. El sistema de raíces del arándano permite definir cuáles son los requerimientos del suelo. Debido a las características de su sistema radicular, los suelos pesados no son aptos para esta especie. Los suelos más favorables son los livianos, con buen drenaje, profundos y con gran contenido de materia orgánica (del 3 al 5%) (PROAIN, 2020) . Adicionalmente, se requiere de un suelo con pH ácido (Ostrolucká et al., 2007) de entre 4,4 a 5,5, aunque también se han visto plantaciones exitosas en suelos con pH de 6,0 (Fertilab, 2013).

Agua. Debido a las características del sistema radicular del arándano, lo hacen sensible al exceso y déficit de agua. Otra condición para monitorizar en el agua es la salinidad ya que esta especie es muy sensible estos cambios (Fertilab, 2013).

Importancia en Ecuador y el mundo

El arándano es considerado como un super alimento debido a los diversos beneficios que brinda a la salud humana y sus propiedades organolépticas. Inclusive se la considera como “la super fruta de del siglo XXI”. Además, contiene gran cantidad de fibra, vitaminas, minerales y antioxidantes. Su producción está ampliándose en el mundo y en Ecuador.

La especie *V. corymbosum* es originaria de Estados Unidos y Canadá, donde se empezó a domesticar a partir de 1900. Actualmente, el principal productor e importador de arándano en el mundo es Estados Unidos (Lerma et al., 2019) y es uno de los cultivos más grades en Canadá, Europa, Australia y Nueva Zelanda (Padmanabhan et al., 2015). Por su lado, el cultivo de *V. corymbosum* en Sudamérica comenzó durante los 80’s, donde ha sido cultivado mayormente en Perú y Chile y, menor medida, en Argentina y Uruguay (Edger et al., 2022).

Durante las últimas tres décadas, el breeding de arándano se ha enfocado en producir nuevas variedades que requieran de menos horas de frío, conocidas como arándanos altos del sur o “Southern Highbush Blueberry”. Éstas se han originado a partir de la hibridación interespecífica entre el arándano alto (*V. corymbosum*) y otras especies nativas de Norteamérica como: el arándano siempre verde (*V. darrowii*) y el arándano ojo de conejo (*V.*

ashei) (Almanac, 2023; PROAIN, 2020). Sin embargo, el 90% del genotipo proviene de *V. corymbosum*. Estos cultivares presentan mayor rendimiento, calidad de la fruta y mayor capacidad de adaptación lo que ha contribuido a la expansión del cultivo a nuevas regiones alrededor del mundo como América Latina.

Ecuador, posee las condiciones climáticas ideales y recursos para la producción de arándano (Zapién & Esteves, 2021). Actualmente, el cultivo se contabiliza en 50 hectáreas en Loja. La producción de este fruto se ha expandido a las provincias del Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua y Azuay (Universo, 2022). En la Costa se encuentran en etapa de ensayos con diferentes variedades en Manabí, El Oro y Santa Elena (Fepexa, 2023; Primicias, 2022).

La industria privada ecuatoriana brinda capacitaciones para la exportación de este producto. El Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) considera que la producción de este fruto es rentable gracias al aumento en la demanda del producto y los rendimientos son competitivos a nivel internacional. En 2022, las exportaciones del fruto se realizaron a los Países Bajos, Alemania y Singapur (AGROCALIDAD, 2022). Al momento, el arándano puede ser exportado a 40 destinos alrededor del mundo (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2022).

Cultivo de Tejidos Vegetales

En 1902, Gottlieb Haberlandt publicó por primera vez sobre el cultivo de tejidos y micropropagación de plantas. Él exploró la totipotencia y morfogénesis en especies vegetales. A pesar de los esfuerzos para explorar esto, no tuvo éxito debido a la falta de conocimiento de los componentes del medio de cultivo.

El cultivo de tejidos vegetales o micropropagación es un conjunto de técnicas que permiten la cría de plantas, órganos, tejidos o células enteras en condiciones asépticas y controladas (Phillips & Garda, 2019). Permite la producción de gran número de plantas a corto plazo (Bhatia et al., 2015).

Los tejidos vegetales pueden cultivarse *in vitro* ya que la célula vegetal es totipotente. La célula retiene toda la información necesaria para regenerar una planta completa. Mediante la dediferenciación, la célula adquiere propiedades diferentes a la célula madre (Daorden, 2008) .

La micropropagación se realiza en ambientes controlados, espacios pequeños y con menor mano de obra (Aquiye, 2020; Hine & Abdelnour, 2013). Para el crecimiento del cultivo se usa un cuarto limpio y aséptico. También se requiere un fotoperiodo e intensidad lumínica para la su incubación (Read & Preece, 2014). El flujo de fotones óptimo y los niveles de luz varían entre especies (Bhatia et al., 2015). En los sistemas de cultivo de tejidos contienen todos los nutrientes, energía y agua necesaria para las especies vegetales. Además, se controlan las condiciones de incubación, la cantidad de luz y la temperatura que promueve el crecimiento de los explantes (Castillo, 2020). La parte vegetal que se cultiva *in vitro* es conocida como “explanto” o “explante”, y es autotrófico (Daorden, 2008).

Los protocolos de micropropagación son diferentes en cada especie y su éxito depende de una amplia gama de factores. Por ello es necesario investigar para optimizarlos (Royal Horticultural Society, 2023). El desarrollo de las plantas pueden manipularse por la adición de reguladores de crecimiento en las diferentes etapas de crecimiento (Phillips & Garda, 2019). Cabe mencionar que el crecimiento, el desarrollo y la respuesta morfogénica de un explante en cultivo *in vitro* está influenciado por sus genotipos, el entorno y la composición del medio (Chimdessa & Agricultural, 2020). También se incluye la fuente del material vegetal, condiciones ambientales de la planta madres, los componentes del medio *in vitro* y los procedimientos usados (Read & Preece, 2014).

Aplicaciones del cultivo de tejidos y sus ventajas

Propagar nuevas variedades

La micropropagación permite la multiplicación eficiente y en corto plazo, usando menor cantidad de recursos (Royal Horticultural Society, 2023), que la propagación tradicional. De

esta manera se mejora el rendimiento del cultivo. Con estas técnicas es posible producir millones de clones al año con poco material vegetal inicial. Además, es posible almacenar grandes cantidades de plantas en espacios reducidos (Bhatia et al., 2015).

Multiplicar plantas difíciles de propagar

La técnica de micropropagación es una alternativa para multiplicar especies que tiene resistencia a la propagación tradicional (Bhatia et al., 2015).

Producir plantas libres de enfermedades

Es posible eliminar los problemas fitosanitarios de las plantas micropropagadas al someterlas a tratamientos físicos y químicos. De esta manera se garantiza un cultivo libre de virus u otros patógenos (Royal Horticultural Society, 2023). Para ello se usa el cultivo meristemático (Bhatia et al., 2015).

Producir plantas con propiedades deseables

Es posible reproducir variedades a gran escala y también desarrollar nuevos cultivares en menor tiempo (Bhatia et al., 2015). Para ello este último fin se pueden usar técnicas como la mutagénesis química o la edición genética.

Conservación de especies

Se puede conservar diversas especies de plantas en espacios reducidos y también almacenar su germoplasma (Bhatia et al., 2015).

Micropropagación

La micropropagación es una técnica de propagación vegetal asexual. Se puede obtener una descendencia uniforme con plantas genéticamente idénticas o clones a la planta madre. Esta técnica es usada para la multiplicación de plantas e ingeniería genética (BioPlan, 2019) o cultivares nuevos.

Explantos más usados para la propagación *in vitro* son yemas vegetativas de las plantas (Ostrolucká et al., 2007).

Tipos de explantes usados en la micropropagación

Cultivo de meristemos. Este cultivo se regenera a partir brotes inducidos a partir de meristemos. En la punta del brote se encuentra el meristemo, el cual se puede cultivar con el primordio foliar. Estos se convierten en micro explantes que tienen un tamaño de 0,4 5 0,5 mm y son usados para obtener plantas libres de virus y de enfermedades. Sin embargo, si el objetivo es solo la micropropagación, el tamaño de este explante no es importante (Bhatia et al., 2015)

Cultivo meristemo apical. Los explantes usados para este cultivo son los meristemos apicales de los brotes, hojas sin expandirse, primordios foliares. Estos explantes se cultiva en medios con citoquininas, que suprime la dominancia apical y se facilita la formación de brotes ramificados. Luego los brotes se traspasan en el medio de enraizamiento para desarrollar plántulas (Bhatia et al., 2015).

Cultivo de semilla. La técnica del cultivo de semilla en la micropropagación es eficaz para muchas plantas ya que pueden obtenerse múltiples brotes a partir de un embrión (Bhatia et al., 2015).

Cultivo de un solo nodo. Las plantas maduras o plántulas tienen nudos simples que pueden usarse como explantes. Cuando se tratan con citoquininas *in vitro* pueden producir ramas. En el medio de enraizamiento los brotes axilares producen raíces, formando así plántulas (Bhatia et al., 2015).

Métodos de producción en la micropropagación vegetal:

Organogénesis directa. Mediante este método, cualquier explante (raíz, cotiledón u hoja) cultivado produce brotes de manera directa. Las células de los explantes se someten directamente a organogénesis y producirán plantas (Bhatia et al., 2015).

Organogénesis indirecta. En este cultivo se manipulan los reguladores de crecimiento para inducir un callo de dediferenciación en los cortes de los explantes. Este callo, da lugar a nuevos brotes (Bhatia et al., 2015).

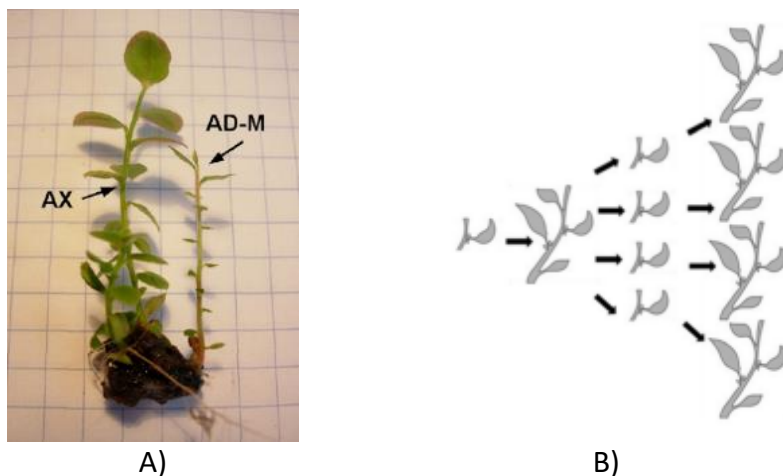
Embriogénesis somática. Es un método que tiende a acumular más mutaciones espontáneas (Phillips & Garda, 2019).

Cultivo de embriones cigóticos. Este cultivo ayuda a superar la dormición y contrarrestar los inhibidores en el endospermo. Además, permite realizar estudios fisiológicos y nutricionales. Ayuda a acortar el ciclo de mejora genética y rescatar híbridos de cruzamientos vegetales (Daorden, 2008) .

Método de ramificación axilar. El método de la ramificación axilar permite regenerar plantas a partir de cultivo de tejidos y es la base de la mayoría de los protocolos de micropropagación o clonación (Phillips & Garda, 2019). Tiene la ventaja de minimizar las mutaciones espontáneas en la materia prima y garantizar una progenie homóloga. Por tanto, se lo usa para la propagación clonal de genotipos valiosos o plantas leñosas recalcitrantes (Lambardi et al., 2013). Las yemas axilares son meristemos que pueden ser estimulados para ramificarse y multiplicar el número de brotes (Figura 3B). A partir de ellos, se pueden separar y enraizar para su comercialización o también conservarlos para mantener un banco de germoplasma.

Figura 3

A) Brotes axilares (AX) y brotes adventicios (AD-M) junto a la base en *V. corymbosum* cv. "Herbert". B) Micropropagación y cultivo de meristemos.



Nota: A) Recuperado por Litwińczuk, Wojciech, & Wadas, M. (2008). Auxin-dependent development and habituation of highbush blueberry (*Vaccinium × covilleatum* But. et Pl.) “Herbert” *in vitro* shoot cultures. *Scientia Horticulturae*, 119(1), 41–48. B) Recuperado por Modo de ramificación axilar originada a partir de meristemas axilares. Obtenido de Phillips & Garda (2019).

Mediante este método se cultivan explantes en medios con altas concentraciones de citoquininas las cuales suprimen la dominancia apical y permiten el desarrollo de estas yemas axilares a partir de los meristemas axilares (Espinosa-Leal et al., 2018). En este método se usa normalmente un ratio de citoquinina y auxina de 10:1. Además, la concentración de la citoquinina usada es proporcional al desarrollo del cultivo o la planta madre. Se debe considerar que el requerimiento de citoquininas es variable y dependiente de la especie o cultivar (Bhatia et al., 2015).

Fases de la micropropagación de plantas

Las fases del proceso de la micropropagación se realizan en cuatro pasos. Estas etapas fueron reconocidas por Murashige en 1978. Las fases del I a III son realizadas en condiciones *in vitro*, mientras la IV etapa es realizada en condiciones de invernadero (Figura 4). Adicionalmente, la etapa 0 fue introducida al sistema por Debergh y Mane en 1981 (Bhatia et al., 2015).

Etapas 0: Selección de la planta madre o plantas élite. La primera etapa en la micropropagación es la selección de plantas élite, las cuales tienen características deseables producirlas a gran escala (Royal Horticultural Society, 2023). La planta seleccionada para la micropropagación es llamada planta madre o planta donante. La ausencia de patógenos endógenos como virus, bacterias y hongos es necesario para la micropropagación de una planta (Read & Preece, 2014) Posterior a su elección se requieren tener condiciones ambientales controladas (Bhatia et al., 2015).

Etapa I: Establecimiento y desinfección. La selección de explantes de la etapa 0 son sometidos a tratamientos de desinfección con agentes esterilizantes. El objetivo de la micropropagación es producir una población de un genotipo uniforme, clonación o propagación asexual (Read & Preece, 2014). Se esterilizan las superficies de los explantes usando diferentes químicos como hipoclorito de sodio, cloruro de mercurio, alcohol cono diferentes tiempos de contacto, en combinación o solos dependiendo de la contaminación.

Posteriormente, se los establece en un medio de cultivo *in vitro* definido el cual contiene concentraciones adecuadas de reguladores de crecimientos que induzcan brotes (Royal Horticultural Society, 2023). Se debe considerar el agente gelificante, ya que puede tener un impacto en el éxito del proceso de micropropagación. Otros aspectos para considerar son el medio basal y los protocolos de esterilización. Además, el medio de cultivo debe proveer la nutrición adecuada y fuentes de energía para los explantes. Un medio típico contiene micro y macronutrientes inorgánicos, fuentes de energía (sucrosa), moléculas orgánicas como aminoácidos, reguladores de crecimiento (auxinas, citoquininas, giberelinas, etc.) y otras sustancias complejas como agua de coco, jugos de fruta, entre otros (Read & Preece, 2014).

Etapa II: Multiplicación. La fase multiplicación se refiere a la regeneración de brotes a partir de sus explantes iniciales. Se desarrollan brotes individuales partiendo de brotes apicales, para luego cortarlos en múltiples explantes nodales, que pueden subcultivarse o dividirse en brotes separados y colocarse en medios frescos (Read & Preece, 2014) . Para este propósito se usan medios ricos en citoquininas (Bhatia et al., 2015).

También es posible inducir múltiples brotes mediante embriogénesis somática u organogénesis directa. A su vez, cada brote puede ser cortado con al menos una yema axilar y ser subcultivado en nuevos medios mediante divisiones y resiembras en medios semisólidos en intervalo determinao de tiempo (Phillips & Garda, 2019) . El número de brotes será dependiente de la especie vegetal y de las condiciones del medio de cultivo. Inclusive, el

número de explantes pueden tener un incremento exponencial si los factores que afectan su crecimiento han sido previamente optimizados (Royal Horticultural Society, 2023).

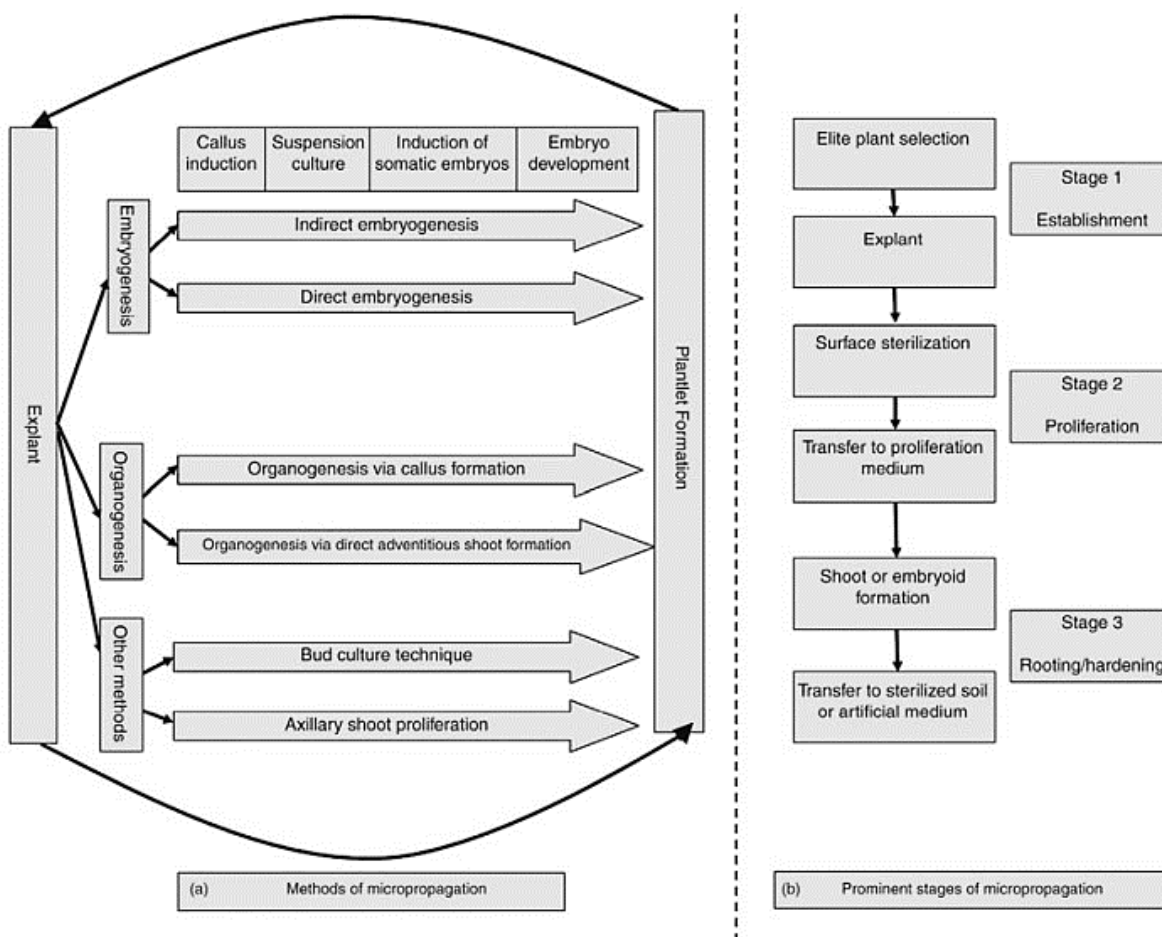
Etapa III: Germinación de embriones somáticos o enraizamiento de brotes regenerados. Los brotes obtenidos en la fase de multiplicación se transfieren a medios libres de reguladores de crecimiento o que solo contenga auxinas. Dependiendo del explante, no se requiere una fase de enraizamiento ya que emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo ya que el proceso de multiplicación y enraizamiento se realizan de forma simultánea (Castillo, 2020; Royal Horticultural Society, 2023). Además, este proceso es dependiente del genotipo entre cultivares de una especie. Durante este proceso, parte de las yemas axilares cercanas al tejido debe convertirse en células meristemáticas de raíz. La competencia celular es inducida por la etiolación de los brotes o mediante la exclusión de la luz de la base del explante. Para que esto suceda se debe pasar por 3 fases: inducción, iniciación y expresión (Read & Preece, 2014). Para el enraizamiento *in vitro* se usan aquellos explantes que miden aproximadamente 2cm. También se puede enraizar directamente en sustrato con alta humedad (Bhatia et al., 2015; Meléndez-Jácome et al., 2021).

Para el enraizamiento *in vitro* la cantidad de nutrientes puede mantenerse, cambiarse o reducirse. Generalmente, se reduce a la mitad la concentración de macronutrientes y se debe reducir la humedad. Estos medios generalmente contienen auxinas en concentraciones micromolares (Read & Preece, 2014).

Etapa IV: Endurecimiento. Las plántulas del enraizamiento son preparadas para llevarlas a condiciones externas. Durante este proceso, ellas se vuelven resistentes al estrés, humedad y patógenos. Además, de cambiar las condiciones heterótrofas en el cultivo *in vitro* a condiciones autótrofas. Se desarrollan correctamente las raíces y se forma cera cuticular en los tejidos aéreos. Para lograr esto, es necesario protegerlas de la luz directa y debe reducirse la humedad relativa (Castillo, 2020). Posterior a ello, las plántulas pueden ser llevadas a cambio abierto (Bhatia et al., 2015).

Figura 4

Esquema del proceso de micropropagación donde se destaca los métodos y principales etapas.



Nota: Obtenido de Bhatia, S., Sharma, K., Dahiya, R., & Tanmoy, B. (2015). Micropropagation.

In *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences* (pp. 361–332).

<https://doi.org/10.1201/b17338-47>.

Composición del medio de cultivo

El medio de cultivo es una mezcla de nutrientes y reguladores de crecimiento. Este cultivo, surgió a partir de estudiar las necesidades nutricionales de plantas. Cabe señalar que los requisitos nutricionales para el crecimiento óptimo del cultivo *in vitro* son dependientes de la especie, el tipo de explante usado y la etapa del proceso de micropropagación (Chimdessa, 2020).

La composición del medio de cultivo es uno de los factores más importantes en el crecimiento y la morfogénesis de los tejidos vegetales. Las necesidades nutricionales de las células vegetales son similares a los de plantas enteras. En el medio se adicionan elementos minerales que aportan con sales comunes, hidratos de carbono y se incluyen trazas de compuestos orgánicos como vitaminas y reguladores de crecimiento (Chimdessa, 2020).

Macronutrientes y micronutrientes. Los macronutrientes son elementos que las plantas necesitan en cantidades superiores a 0,5 g/L. Hay seis elementos principales: nitrógeno, fósforo, potasio, calcio magnesio y azufre. La concentración óptima de cada elemento es dependiente de una especie (Chimdessa, 2020).

Los micronutrientes son elementos que las plantas requieren en pequeñas cantidades que no superan los miligramos o menores a 0,5 g/L. Los microelementos necesarios en el cultivo *in vitro* son el hierro, manganeso, zinc, boro, cobre, cobalto y molibdeno (Chimdessa, 2020).

Anderson Rhododendron Medium (AN). Este medio contiene nutrientes descritos por Anderson en 1984 (Tabla 2). Tiene una baja concentración de nutrientes inorgánicos y se utiliza para la micropropagación convencional de rododendros y otras plantas de la familia *Ericaceae* (CliniSciences, 2022).

Medio Murashige Skoog (MS). Uno de los medios más comúnmente usados en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Posee elevada concentración salina e incluye macronutrientes, micronutrientes y vitaminas.

Lloyd y McCown Woody Plant Medium (WPM). Este medio es una mezcla de nutrientes inorgánicos que proporciona los macroelementos y microelementos para el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, descritas por Lloyd y McCown (1981). Contiene menos concentraciones de macronutrientes que los anteriores y WPM tiene menos cantidad de nitrógeno que el medio MS (Phillips & Garda, 2019) . Además, el nitrato de potasio se ha eliminado de este medio y sustituido por sulfato de potasio (PhytoTech Labs, 2023). Es

ampliamente usado en la propagación de plantas, en especial las leñosas (Tabla 2), y no se recomienda para aquellas sensibles a la salinidad.

Tabla 2

Composición de medios basales y sus concentraciones.

| Compuestos | Concentración (mg/L) | |
|---|--|---|
| | Lloyd y McCown Woody Plant Basal Medium (WPM) | Mezcla basal de sales de Anderson (AN) |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 0,25 | 0,025 |
| Na ₂ EDTA.2H ₂ O | 37,3 | 74,5 |
| H ₃ BO ₃ | 6,20 | 6,20 |
| MnSO ₄ .H ₂ O | 22,30 | 16,90 |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 0,25 | 0,25 |
| CoCl ₂ .6H ₂ O | - | 0,025 |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 27,85 | 55,7 |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 8,60 | 8,60 |
| CaCl ₂ | 72,50 | 332,2 |
| Ca(NO ₃) ₂ | 386,00 | - |
| KH ₂ PO ₄ | 170,00 | - |
| K ₂ SO ₄ | 990,00 | - |
| MgSO ₄ | 180,7 | 180,7 |
| KI | - | 0,30 |
| KNO ₃ | - | 480,00 |
| NH ₄ NO ₃ | 400,00 | 400,00 |

Nota: Obtenido de PhytoTech Laboratories (2023).

Vitaminas. En los cultivos celulares vegetales es requerido suplementar vitaminas que actúan como coenzimas. Las vitaminas más usadas son del grupo B como la tiamina, ácido nicotínico, niacina, piridoxina y mio-inositol. También se puede suplementar ácido pantoténico, la vitamina C, la vitamina D y la vitamina E. En el cultivo de tejidos vegetales, solo la tiamina y el mio-inositol se consideran ingredientes esenciales. Sin embargo, en algunos cultivos se pueden presentar carencias de algunos factores y añadiendo vitaminas es posible mejorar su crecimiento. Por ejemplo, el ácido ascórbico, puede evitar la oxidación y en el ennegrecimiento de explantes (Chimdessa, 2020) .

Aminoácidos o suplemento de nitrógeno. Los aminoácidos tienen un rol importante en la nutrición de los tejidos vegetales. Estos complementos son necesarios para el crecimiento óptimo durante el establecimiento de cultivos celulares y protoplastos. Los aminoácidos son una fuente de nitrógeno fácilmente asimilable por los tejidos y células, en comparación con fuentes de nitrógeno inorgánico. Generalmente se usan mezclas de caseína, hidrosilato, L-glutamina, L-asparagina y adenina como fuentes de nitrógeno orgánico (Saad & Elshahed, 2012).

Fuentes de carbono. Las células cultivadas *in vitro* son heterotróficas por lo que se requiere agregar azúcares en el medio de cultivo. Las fuentes de carbono son fuentes de energía y aumentan el potencial osmótico del medio. La fuente más usada es la sacarosa en concentraciones de 2 a 4% (p/v). Sin embargo, también se pueden usar la glucosa, fructosa, trehalosa, maltosa o lactosa (Quiñones, 2007).

Reguladores de crecimiento. Los reguladores de crecimiento vegetal son moléculas orgánicas que tienen la capacidad de regular los procesos de desarrollo de las plantas, y son eficaces a bajas concentraciones. Los efectos de los reguladores dependen de la especie, el órgano vegetal, estado de desarrollo y las concentraciones endógenas y exógenas (UNLP, 2011).

Los reguladores resultan útiles en el establecimiento de cultivos *in vitro* y también para la producción de metabolitos secundarios. Estos pueden clasificarse en diferentes categorías de acuerdo con su estructura como: auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno o ácido abscísico. Se pueden expresar las concentraciones de los reguladores de crecimiento en mg/L. Cabe señalar que el mismo tratamiento con reguladores de crecimiento a explantes de diferentes especies o genotipos, pueden tener diferentes efectos (UNLP, 2011).

Auxinas. Las auxinas son reguladores de crecimiento que moderan la división, crecimiento y la diferenciación de raíces en los cultivos *in vitro*. También, están involucradas en varios procesos de desarrollo como intervención en el tropismo a la gravedad y la luz (curvatura), la diferenciación de los tejidos vasculares (UNLP, 2011), la inducción a brotes, embriogénesis somática y estimular el crecimiento de brotes apicales (Saad & Elshahed, 2012).

Las auxinas aumentan la plasticidad de la pared celular y permite la expansión de la célula. La elongación inducida por auxinas inicia cuando la hormona se une al receptor de la membrana plasmática que causa acidificación en la célula. Como resultado proteínas hidrolíticas rompen enlaces dentro de la celulosa y permite la elongación de la célula (UNLP, 2011). Además, las auxinas se distribuyen desde el ápice de la planta hasta la base, reprimiendo el desarrollo de brotes axilares laterales y manteniendo la dominancia apical (Jordán & Casaretto, 2006).

Las auxinas más usadas son el ácido α -naftalenacético (ANA) y el ácido indol-3-butírico (IBA), seguido por el 2,4-dicloro-fenoxi-acético (2,4-D), ácido indol-3-acético (IAA) y picloram (PIC). Es común que ANA, IBA e IAA sean usados en las etapas de multiplicación y cultivos de enraizamiento. También pueden ser usadas para estimular la formación de callos (Phillips & Garda, 2019).

Ácido indol-3-butírico (IBA). El IBA es una auxina endógena de la planta, más eficiente que el IAA al promover la formación de raíces laterales y es usada principalmente para este propósito (Jordán & Casaretto, 2006).

Citoquininas. Las citoquininas o citocinas son un grupo de fitorreguladores derivados de la adenina, las cuales promueven la división, la diferenciación celular, formación de brotes axilares y adventicios (Iliev, 2017), incrementan el tamaño del tejido, auxilian en el proceso de inducción y diferenciación celular o puede retrasar la senescencia de los tejidos (Antama, 2017). Cuando las citoquininas se encuentran en altas concentraciones, pueden inducir a la apertura de yemas laterales en diferentes especies. La aplicación de estos reguladores puede reducir la influencia de la yema apical y estimular la brotación lateral. En el cultivo celular, las citocinas inducen la formación de callo en diferentes especies vegetales (Jordán & Casaretto, 2006).

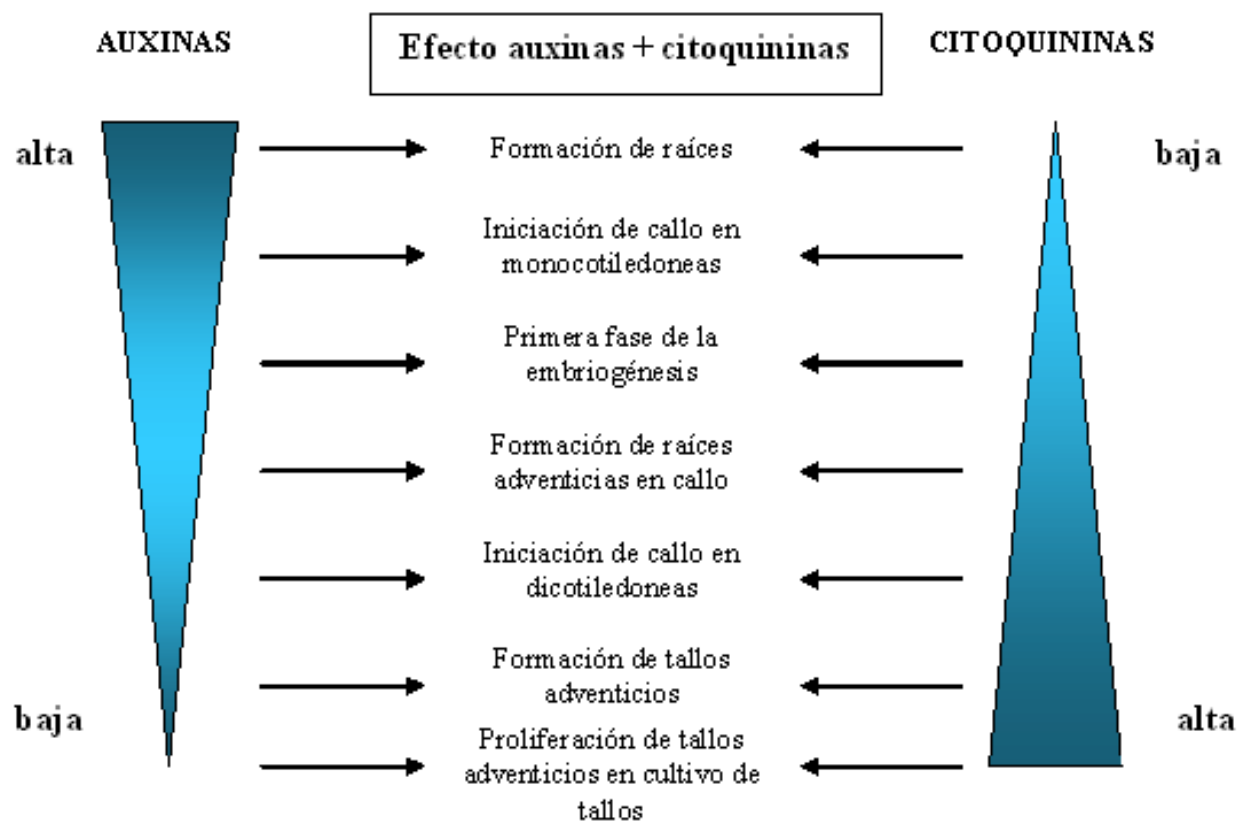
Las citoquininas pueden formarse en cualquier tejido vegetal, pero en especial en las raíces. La mayor concentración de citoquininas se presenta en momentos con gran división celular. Sin embargo, cualquier tejido que no presente actividad, está produciendo pocas citoquininas (Corona, 2020). La citoquinina más usada es la N6-bencil adenina (BA), seguida por la kinetina (KIN). También pueden usarse el tidiazurón (TDZ), 2-isopenteniladenina (2-iP) y zeatina (ZEA) (Phillips & Garda, 2019).

Las respuestas de totipotencia celular, morfogénesis *in vitro* y de regeneración ocurre en presencia de niveles apropiados de citoquininas y auxinas. Si combinan diferentes niveles de auxinas y citocinas pueden darse diferentes respuestas alternativas (Jordán & Casaretto, 2006) (Figura 5):

- Altos niveles de ambas hormonas conducen a la multiplicación celular y baja desdiferenciación.
- Alto nivel de citocinas permite la formación de nuevos brotes.
- Alto nivel de auxinas se realiza la formación de raíces
- Cuando existe bajos niveles de citocinas y/o niveles altos de auxina, se produce la formación de masas celulares no organizadas o callos (Jordán & Casaretto, 2006)

Figura 5

Relaciones de auxinas y citoquininas necesarias para el crecimiento y la morfogénesis.



Nota. Recuperado de Pelacho, A., Martín, L., & Sanfeliu, J. (2005). *Medios*. Universidad de Lleida. <http://cv.udl.cat/cursos/76304/t5/t5.html>

Zeatina. Compuesto derivado de la adenina la cual es requerida para procesos de desarrollo en las plantas como el crecimiento vegetativo y la inducción floral. ZEA permite la germinación y retarda el envejecimiento de hojas y frutos. Además, induce la formación de brotes, mejora la floración y ruptura de la dominancia apical (Cayo & Peralta, 2021).

Al ser una citoquinina natural, es costosa y químicamente inestable (Phillips & Garda, 2019). La zeatina interviene como un inductor en la división celular y el desarrollo de cloroplastos (Cayo & Peralta, 2021).

2-isopentenilo adenina (2iP). Es un regulador del crecimiento de la planta el mismo que permite estimular la división celular, crecimiento y desarrollo se lo utiliza en cultivos *in vitro* para obtener callos de germinación (Cayo & Peralta, 2021).

Agente gelificante El agente gelificante es un sólido que, al añadirse en el medio de cultivo, hace que el medio adquiera la consistencia de gel. Este agente debe cumplir con ciertos requisitos como (Pelacho et al., 2005):

- No ser asimilable por el explante. Esto haría que, al consumirse el medio, éste se volviera líquido.
- No interferir en la absorción de los nutrientes del medio de cultivo.
- Permanecer estables durante el tiempo de cultivo.

El agente gelificante de preferencia en cultivos *in vitro* es el agar, el cual es un polisacárido natural no ramificado y de alto peso molecular, proveniente de las algas rojas. Contiene pocas cantidades de impurezas y se caracteriza por tener alta disolución, ser termoreversible y autoclavable (Pelacho et al., 2005) .

Potencial de hidrógeno. El crecimiento de las plantas depende del pH, siendo el rango óptimo entre 5,0 a 6,5, sin embargo, cada especie tiene su rango óptimo. En el cultivo *in vitro*, el pH adecuado es entre 4,8 – 6,0. Este parámetro no causa el desarrollo de los explantes, pero puede limitar el crecimiento o diferenciación celular.

El pH del medio de cultivo puede regularse mediante soluciones de hidróxido de sodio (NaOH), hidróxido de potasio (KOH) o cloruro de hidrógeno (HCl). El pH luego de regularse desciende luego de la esterilización, en dependencia de la composición del medio y del agente gelificante (Pelacho et al., 2005) .

Condiciones de incubación. Los cultivos de tejidos vegetales son incubados en cuartos crecimientos. Estas instalaciones deben proveer un control de temperatura, intensidad de luz variable, control del fotoperiodo y humedad (Pelacho et al., 2005).

Capítulo III: Metodología

Localización del proyecto y fuente de material vegetal

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la empresa CONECTIFLORANDINO CIA. LTDA. Los explantes del arándano alto del sur *Vaccinium corymbosum* L. fueron provistos por la empresa misma que está ubicada en el cantón Cayambe, provincia de Pichincha.

Evaluación del medio de cultivo para inducción de brotes

Durante la etapa de inducción a brotes se evaluó la interacción de medios basales y citoquininas. Luego del tratamiento de desinfección en cámara de flujo laminar (información no presentada), se procedió a cortar el tejido que presentara oxidación y segmentar en micro-estacas de longitud aproximada de 1,0 - 2,0 cm con una o dos yemas (Figura 6).

Posteriormente se retiró los vestigios de las hojas previo a la inoculación.

Figura 6

Micro-estaca de Vaccinium corymbosum L. posterior a los tratamientos de desinfección dentro de la cámara de flujo laminar e inoculada en el medio de inducción de brotes.



Durante esta etapa se evaluaron dos medios basales: WPM y AN y se evaluó su interacción con 2 niveles de dos citoquininas: ZEA y 2-iP, resultando en ocho formulaciones para el medio de establecimiento (Tabla 3). Adicionalmente, se evaluaron dos controles negativos con los dos medios basales y sin citoquininas. Se implementó un diseño factorial 2^3 con ocho tratamientos y 20 repeticiones.

En todos los ensayos se usaron frascos de plástico, que contenían 15 mL de medio. Y se introdujo un explante por cada medio de cultivo, manteniendo la asepsia en cámara de flujo laminar.

Tabla 3

Tratamientos de dos medios basales y las concentraciones de las dos citoquininas evaluadas en la fase de inducción a brotes.

| Tratamiento | Medio basal | Citoquinina | Concentración (mg/L) |
|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------------------|
| I0 (control) | WPM | N/A | 0 |
| I1 | WPM | 2iP | 2,5 |
| I2 | WPM | 2iP | 5,0 |
| I3 | WPM | ZEA | 1,0 |
| I4 | WPM | ZEA | 2,0 |
| I01 (control) | AN | N/A | 0 |
| I5 | AN | 2iP | 2,5 |
| I6 | AN | 2iP | 5,0 |
| I7 | AN | ZEA | 1,0 |
| I8 | AN | ZEA | 2,0 |

Al finalizar el periodo de cultivo, se evaluaron las siguientes variables de respuesta:

- *% Brotación*: La cantidad de segmentos nodales brotados dividido para la cantidad de explantes viables multiplicado por cien. *Nota*: Se considera un segmento brotado aquel explante con un brote de longitud mayor a 0,5 cm.
- *Índice de multiplicación*: El número de explantes sembrados sobre la cantidad de brotes viables al final de la etapa.
- *Longitud de brotes*: Distancia comprendida desde la parte basal del brote hasta el ápice o yema terminal.

Fase de Multiplicación

Durante la fase de multiplicación se efectuaron dos ensayos. En el primero se evaluó la interacción de medios basales y citoquininas. En el segundo se evaluó la presencia de IBA en los medios de multiplicación.

Se usaron los brotes axilares libres de contaminación procedentes de los ensayos previos de inducción a brotes. Los brotes obtenidos fueron segmentados en secciones de aproximadamente 1,0 - 1,5 cm y trasladados a los medios de multiplicación.

La unidad experimental usada para los siguientes ensayos fue un contenedor de vidrio esterilizado (dimensiones: 6 cm diámetro y 10 cm de alto) con ocho explantes por contenedor.

Primer Ensayo: Evaluación de medios basales con citoquininas

Para el diseño experimental se empleó un diseño en parcelas donde se evaluaron factor (A): Medio basal (AN y WPM) , Factor (B) Citoquininas (*trans*-zeatina y 2iP), Factor (C): Niveles de citoquininas (1,0; 2,0; 3,0 y 2,0; 2,5; 3,0 mg/L). Como resultado se obtuvieron doce formulaciones para el medio de multiplicación (Tabla 4) y se realizaron 4 réplicas de cada uno y dos controles negativos.

Tabla 4

Tratamientos de dos medios basales y las concentraciones de las dos citoquininas evaluadas para los medios de multiplicación.

| Código | Medio basal | Citoquinina | Concentración (mg/L) |
|---------------|--------------------|--------------------|-----------------------------|
| CN1(control) | WPM | N/A | 0 |
| M1 | WPM | ZEA | 1,0 |
| M2 | WPM | ZEA | 2,0 |
| M3 | WPM | ZEA | 3,0 |
| M4 | WPM | 2iP | 2,0 |
| M5 | WPM | 2iP | 2,5 |
| M6 | WPM | 2iP | 3,0 |
| CN2 (control) | AN | N/A | 0 |
| M7 | AN | ZEA | 1,0 |
| M8 | AN | ZEA | 2,0 |
| M9 | AN | ZEA | 3,0 |
| M10 | AN | 2iP | 2,0 |
| M11 | AN | 2iP | 2,5 |
| M12 | AN | 2iP | 3,0 |

Los explantes permanecieron en el medio de multiplicación durante 5 semanas.

Posterior a este periodo se recolectaron los datos de las siguientes variables:

- *% de clorosis*: Porcentaje de explantes que presentaban síntomas de clorosis foliar.
- *Brotación*: Promedio del número de brotes axilares por cada explante.
- *Índice de multiplicación*: El número de explantes sembrados sobre la cantidad de brotes viables al final de la etapa

- *Longitud de brotes*: Distancia comprendida desde la parte basal del brote hasta el ápice o yema terminal.

Se implementó un diseño en parcelas con doce tratamientos y cuatro repeticiones. En cuanto a la estadística, se realizó el análisis usando el software Infostat y GraphPad Prism 9.

Segundo ensayo: Evaluación de IBA en medios de multiplicación

Se evaluó el efecto de la presencia de 0,1 mg/L de IBA en los dos medios de mayor efectividad determinados en el primer ensayo.

Los explantes permanecieron en el medio de multiplicación durante 5 semanas. Al finalizar, se evaluaron las siguientes variables de respuesta:

- *% de clorosis*: Porcentaje de explantes que presentaban síntomas de clorosis foliar.
- *Brotación*: Promedio del número de brotes axilares por cada explante.
- *Índice de multiplicación*: El número de explantes sembrados sobre la cantidad de brotes viables al final de la etapa.
- *Longitud de brotes*: Distancia comprendida desde la parte basal del brote hasta el ápice o yema terminal.

Medio de cultivo

En las formulaciones usadas para la inducción de brotes, se suplementó con 20 g/L de sacarosa, 50 mg/L de ácido ascórbico, 0,1 mg/L de IBA y 6 g/L de agar (PhytoTechnology Laboratories). Mientras que en los tratamientos de la fase de multiplicación se adicionaron con 30 g/L de sacarosa, 50 mg/L de ácido ascórbico, 6 g/L de agar (PhytoTechnology Laboratories).

Previo a la adición de agar se ajustó el pH a 5 con KOH y H₂SO₄ (1N) y se esterilizó en autoclave a 126°C, 1,56 kgf/cm² por 15 minutos. Se agregó 2iP previo a añadir el agar y se esterilizó. Y la ZEA sea añadió filtrándola al medio posterior a la esterilización.

Condiciones de cultivo

Las condiciones de la incubación en el cuarto de crecimiento fueron de 25 °C, densidad de flujo de fotones fotosintéticos de 22,1 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ de luz blanca de lámparas LED, con un fotoperíodo de 16 h y 8 h de oscuridad. Los explantes permanecieron en el medio de inducción durante 5 semanas.

Análisis estadístico

En cuanto a la estadística, se realizó el análisis usando el software Infostat y GraphPad Prism 9. Primero, se aplicaron criterios de normalidad con la prueba de Shapiro-Wilks ($p < 0,05$) y de homocedasticidad en las variables continuas. En caso de cumplir con ambos criterios, se procedió a realizar un análisis de varianza (ANOVA) de las variables. En caso de encontrar diferencias significativas entre las medianas, se procedió a realizar la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$). Cuando la variable continua no presentaba normalidad, se realizó una prueba no paramétrica (prueba de Kruskal-Wallis). Si se encuentran diferencias significativas entre las medias se procedió a realizar la prueba de Dunn. Además, se aplicó la prueba de T para dos muestras con el objetivo de comparar el efecto del tratamiento con su control ($\alpha = 0,05$)

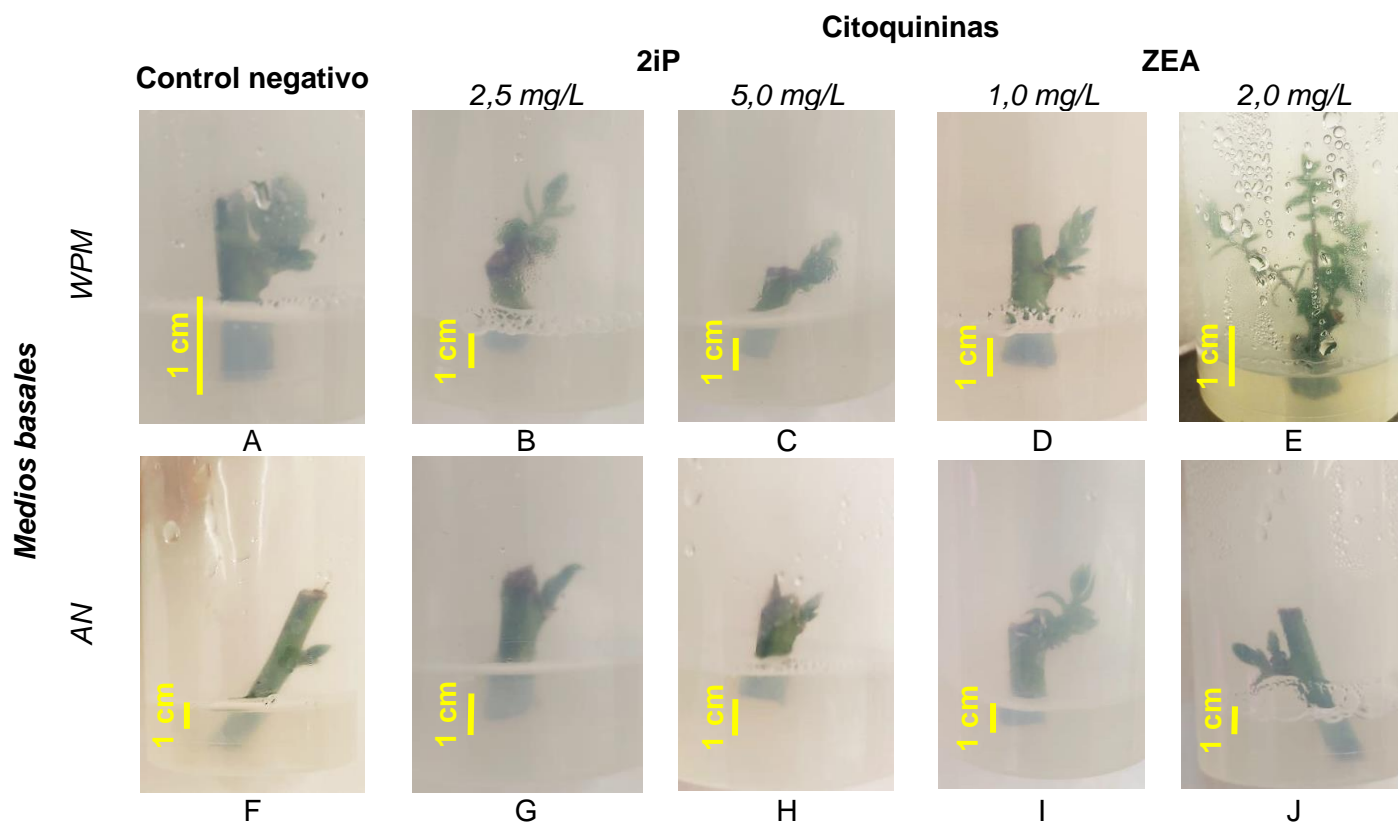
Capítulo IV: Resultados

Medio de cultivo para inducción de brotes

Se evaluaron los medios basales de AN y WPM y su interacción con dos concentraciones de 2iP y ZEA conformando ocho tratamientos con veinte repeticiones. Las variables de respuesta fueron tomadas a la quinta semana de cultivo y fueron: % brotación, IM y longitud de brotes. En varios explantes se observó la formación de callo de coloración verde claro en la base del segmento nodal. También se observó marcas de color negro correspondientes a la manipulación de los explantes en cámara indicando oxidación. Por otro lado, en todos los tratamientos, se observó que la coloración de las hojas fue verde oscuro y buen desarrollo (Figura 7).

Figura 7

Evaluación de medios de cultivo para inducción de brotes a las 4 semanas de cultivo.

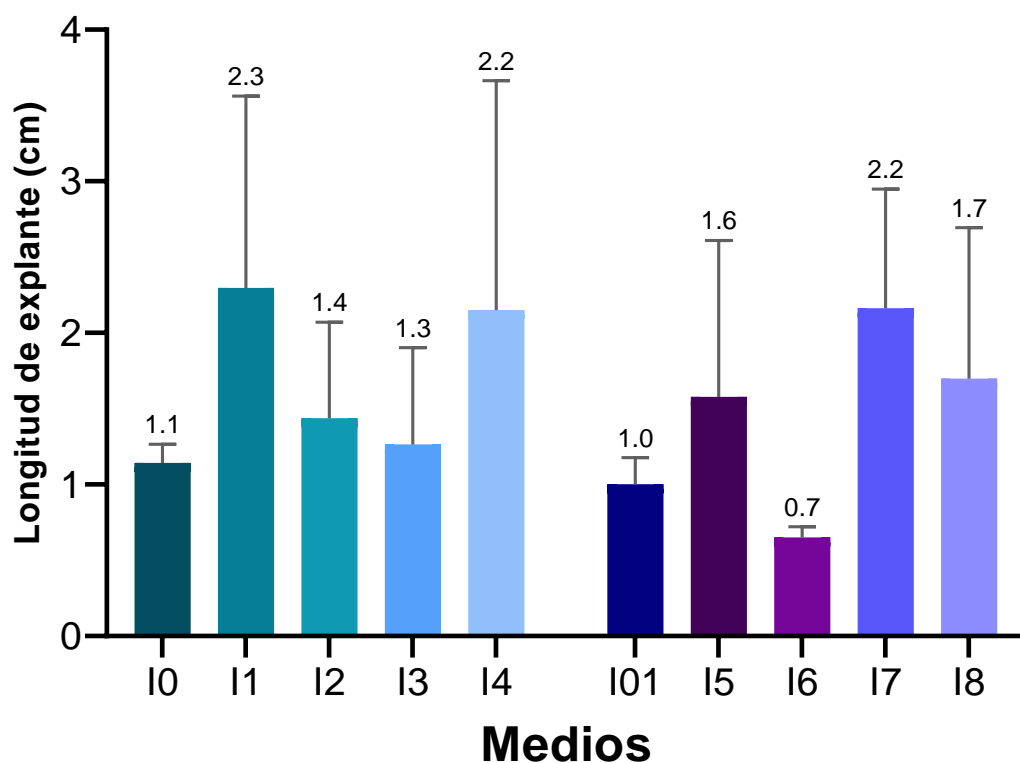


Nota: A) Control negativo con medio basal de WPM sin citoquininas. Explantes en medio basal de WPM con 2iP con B) 2,5 mg/L y C) 5,0 mg/L y ZEA D) 1,0 mg/L E) 2,0 mg/L. F) Control negativo con medio basal de AN sin citoquininas. Explantes en medio basal de AN con 2iP con G) 2,5 mg/L y H) 5,0 mg/L y ZEA I) 1,0 mg/L J) 2,0 mg/L.

En cuanto a la variable de **longitud de brotes**, se realizó la prueba de Shapiro-Wilks la cual confirmó la normalidad de los datos. Se procedió a realizar el ANOVA para determinar las diferencias significativas entre los factores. La prueba paramétrica, no mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) para los factores Medio basal y Tipo de Citoquinina. En contraste, el efecto de la interacción entre estos dos factores (medio basal*citoquinina) sí presentó diferencias significativas. Seguido, se realizó el análisis de comparación de medias (prueba de Tukey; $\alpha = 0,05$) donde se observó que el medio I1 (WPM + 2,5 mg/L 2iP) obtuvo la máxima media con $2,3 \pm 1,3$ cm, seguida por el tratamiento I7 (AN +1 mg/L ZEA) con una media de $2,2 \pm 0,8$ cm. Además, la mínima media ($0,7 \pm 0,1$ cm) se obtuvo con el medio I6 que contiene el medio basal AN suplementado con 5 mg/L de 2iP. A diferencia de 2iP, se observó que la longitud de los brotes aumenta conforme se aumenta la concentración de ZEA en ambos medios basales. Es así como los resultados obtenidos sugieren que la interacción entre el medio basal y la citoquinina influyen en la longitud del brote (Figura 8).

Figura 8

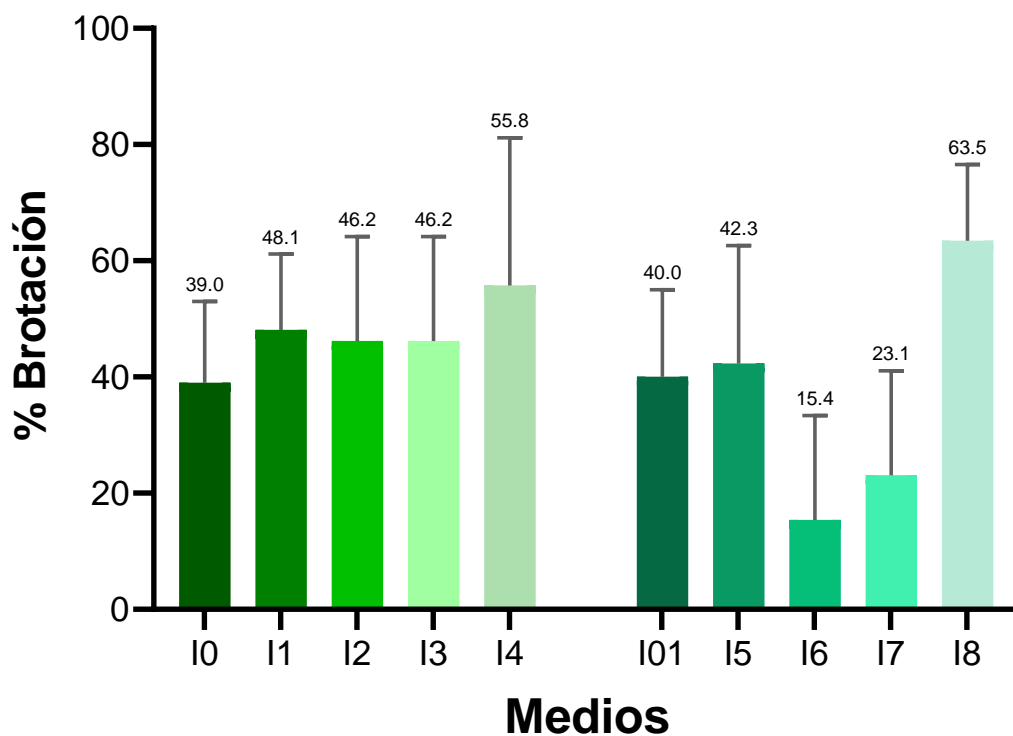
Longitud de los brotes según la composición del medio de cultivo en la etapa de inducción a brotes.



Para el análisis del % **Brotación**, la prueba de Shapiro-Wilks que mostró que los datos no presentan normalidad ($p < 0,05$). Con este resultado se procedió al análisis de Kruskal-Wallis donde se encontró que la interacción entre los tres factores: Medio basal, Citoquinina y Concentración, tiene una diferencia significativa ($p < 0,05$). Posteriormente, se realizó la comparación de múltiples medianas (prueba de Dunn) (Tabla 5) y se encontró que el medio basal influye de manera significativa en la brotación axilar. En base a los resultados (Figura 9), se observa que el aumento de la concentración de ZEA aumenta el % Brotación. En contraste, el aumento de concentración de 2iP disminuye el % Brotación. El mayor porcentaje de brotación se obtuvo (63,5%) en el medio I8 (AN + 2,0 mg/L ZEA) mientras que el menor porcentaje (15,4%) se obtuvo en el medio I6.

Figura 9

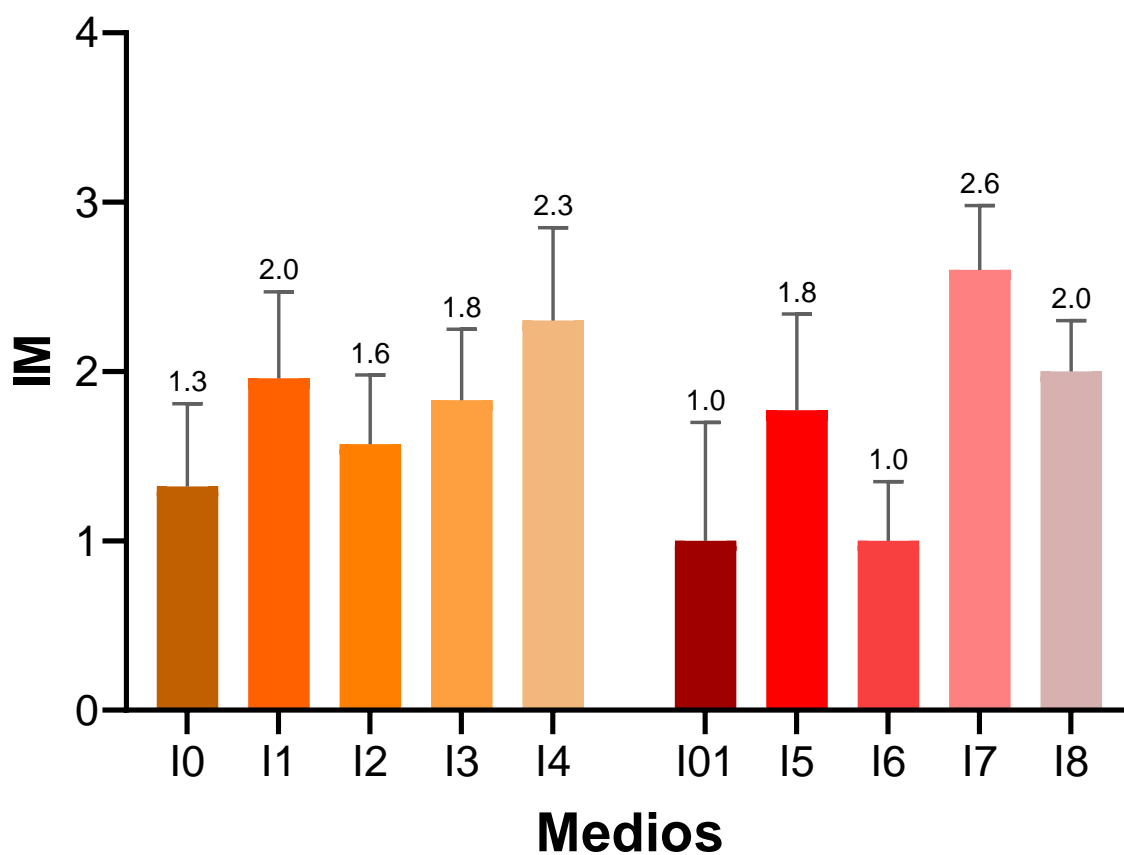
Porcentaje de brotación según la composición del medio de cultivo en la etapa de inducción a brotes a las 5 semanas de cultivo.



En cuanto al **IM**, se observó una reducción en el IM conforme la concentración de 2iP iba aumentando en ambos medios basales. Además, se halló la mayor tasa de propagación ($2,60 \pm 0,38$) en el medio 17 que corresponde al medio basal AN con 1,00 mg/L de ZEA. Mientras que el IM menor (1,00) se realizó en el medio 16, seguido por el control negativo 101 (1,20). Estos tres tratamientos contienen el medio basal AN (Figura 10) lo que sugiere que el IM depende de la interacción entre el medio basal y la citoquinina.

Figura 10

Índice de multiplicación de los brotes según la composición del medio de cultivo en la etapa de inducción a brotes a las 5 semanas de cultivo.



Realizando la prueba T, para comparar los tratamientos con su control negativo, se encontró que todos tienen diferencia significativa, lo que indica que los medios basales y citoquininas sí tienen una influencia en las variables de respuesta. Considerando las variables antes descritas, se puede concluir que la formulación que presenta los mejores resultados para la inducción a brotes de segmentos nodales es el tratamiento I4, con medio basal WPM suplementado con 2,00 mg/L de ZEA. El segundo mejor medio fue el I8 (WPM + 2,00 mg/L ZEA) (Tabla 5).

Tabla 5

Resumen de variables respuesta de los ensayos durante el cultivo en la etapa de inducción a brotes a las 5 semanas de cultivo.

| Código | MB | Cit | Conc. (mg/L) | % Brotación | IM | Longitud (cm) |
|--------|-----|-----|--------------|-------------|-------------|--------------------------|
| I0 | WPM | 0 | 0,0 | 39,0 | 1,32 ± 0,49 | 1,4 ± 0,5 ^{ABC} |
| I1 | WPM | 2iP | 2,5 | 48,1 | 1,96 ± 0,51 | 2,3 ± 1,3 ^A |
| I2 | WPM | 2iP | 5,0 | 46,2 | 1,57 ± 0,41 | 1,4 ± 0,6 ^{ABC} |
| I3 | WPM | ZEA | 1,0 | 46,2 | 1,83 ± 0,42 | 1,3 ± 0,6 ^{ABC} |
| I4 | WPM | ZEA | 2,0 | 55,8 | 2,30 ± 0,55 | 2,1 ± 1,5 ^{AB} |
| I01 | AN | 0 | 0,0 | 40,0 | 1,20 ± 0,50 | 0,9 ± 0,7 ^{ABC} |
| I5 | AN | 2iP | 2,5 | 42,3 | 1,77 ± 0,57 | 1,6 ± 1,0 ^{ABC} |
| I6 | AN | 2iP | 5,0 | 15,4 | 1,00 ± 0,35 | 0,7 ± 0,1 ^C |
| I7 | AN | ZEA | 1,0 | 23,1 | 2,60 ± 0,38 | 2,2 ± 0,8 ^{AB} |
| I8 | AN | ZEA | 2,0 | 63,5 | 2,00 ± 0,30 | 1,7 ± 1,0 ^{ABC} |

Fase de Multiplicación

Para la fase de multiplicación se efectuaron dos ensayos. En el primero se evaluó la interacción de medios basales y citoquininas. En el segundo, se evaluó la presencia de IBA en los medios de multiplicación con mejor desempeño.

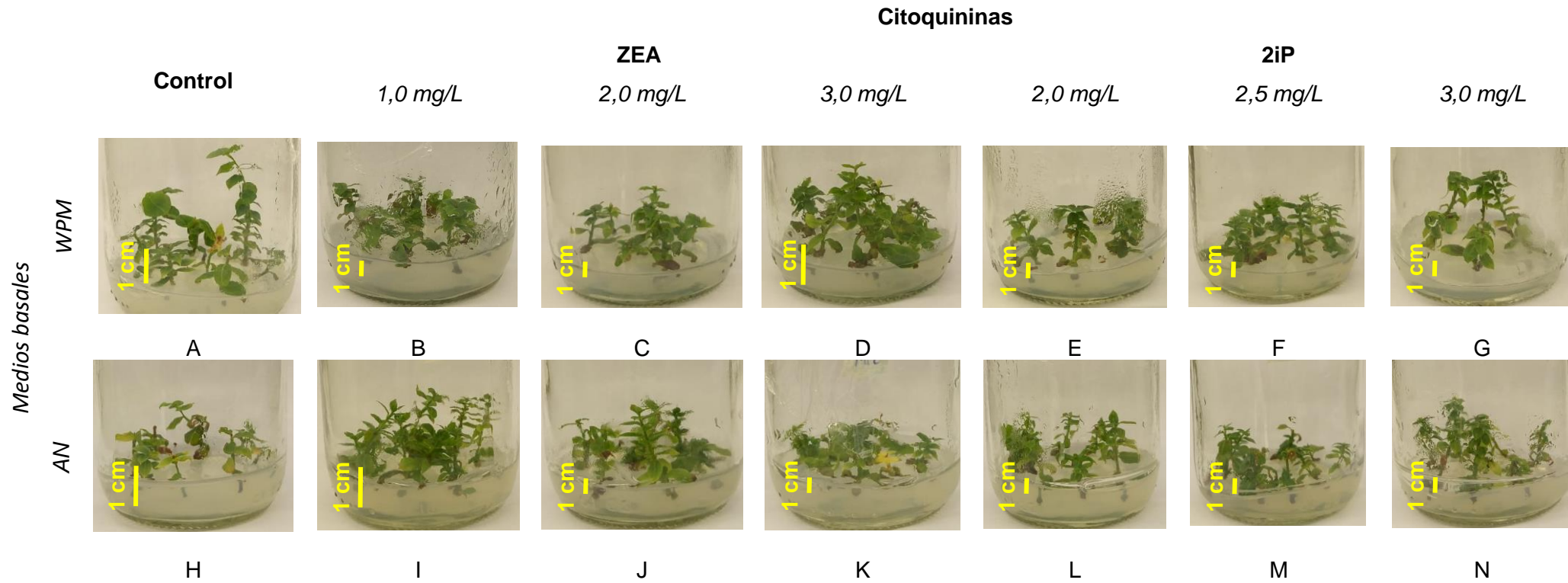
Primer ensayo: Evaluación de medios basales con citoquininas

Se evaluaron los medios basales de AN y WPM, y su interacción con tres concentraciones de 2iP y ZEA, cada uno con cuatro repeticiones. Al finalizar las 5 semanas, se evaluó las variables de respuesta: % clorosis, brotación, IM y longitud de brotes (Tabla 6). Se pudo observar hojas con bordes rojos indicando estrés. En todos los tratamientos existe **clorosis** en diferentes porcentajes, siendo el mayor porcentaje 86,7% en el medio M2 (WPM + 2 mg/L ZEA). En contraste, el menor porcentaje 37,5% se encontró en el tratamiento M12 (AN + 3,00 mg/L 2iP) y el control CN1 (Tabla 6). Ambos controles (CN1 y CN2) evidenciaron clorosis en las hojas superiores o cercanas al ápice. En la base de los explantes se oxidaron o

presentaron formación de callo. En los tratamientos con AN, se encontró necrosis en sección del tallo. En el medio M1, ciertas hojas de los explantes tenían manchas de color café, mientras que el M11 presentó amarillamiento en el borde de las hojas (Figura 11).

Figura 11

Explantes del ensayo de evaluación de medios basales con citoquininas a las 5 semanas del tratamiento.



Nota: A) Control negativo con medio basal de WPM sin citoquininas. Explantes en medio basal de WPM con ZEA B) 1,0 mg/L C) 2,0 mg/L D) 3,0 mg/L y ZiP con E) 2,0 mg/L F) 2,5 mg/L y G) 3,0 mg/L. H) Control negativo con medio basal de AN sin citoquininas. Explantes en medio basal de AN con ZEA I) 1,0 mg/L J) 2,0 mg/L K) 3,0 mg/L y ZiP con L) 2,0 mg/L M) 2,5 mg/L y N) 3,0 mg/L.

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos de la **longitud del explante**, se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks, donde el valor P ($<0,0001$) es menor al nivel de significancia (0,05), por lo cual los datos no presentan una distribución normal. Se comprobó este resultado realizando un Q-Q plot (Figura 11A) y se realizó un histograma (Figura 11B) que corrobora que los datos no siguen la tendencia normal.

Se obtuvo que un p valor para: Medio Basal (0,2164), Citoquinina (0,7805) y Concentración (0,2378), mayores al nivel de significancia (0,05). Por tanto, se comprueba la homocedasticidad de los datos.

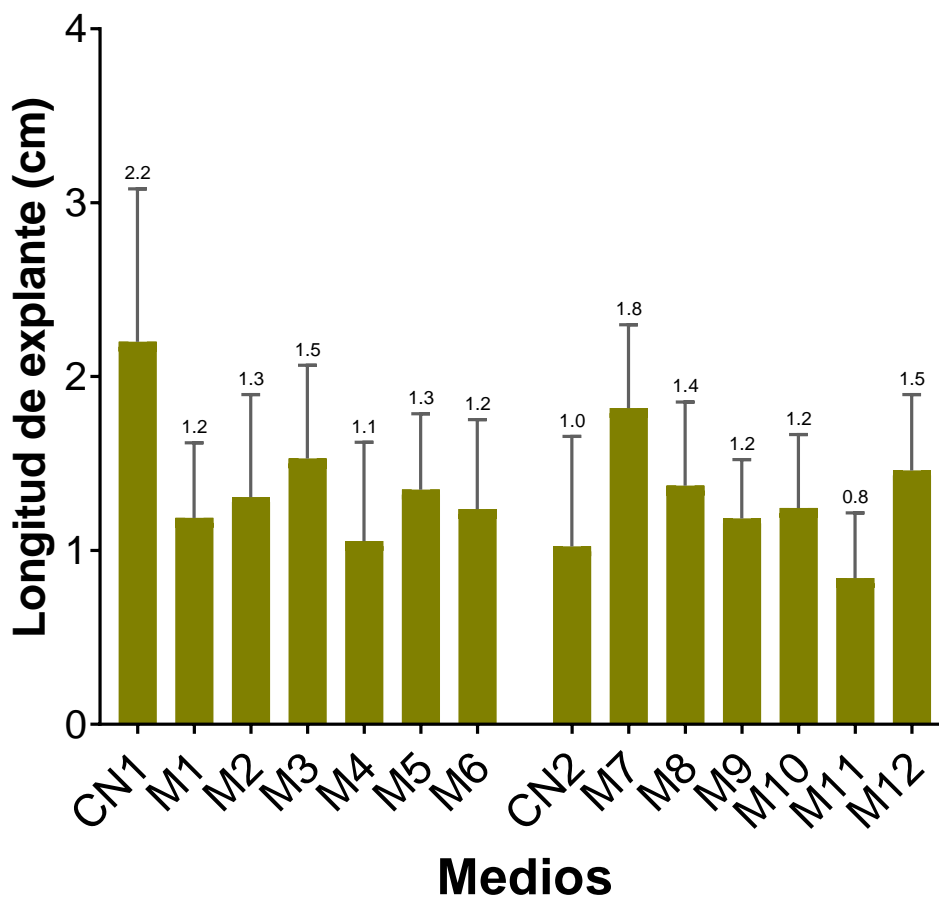
Posteriormente, se analizaron los datos de la longitud del explante mediante la prueba de Kruskal-Wallis para cada variable independiente. Esta prueba mostró diferencias significativas para los factores: “Tipo de Citoquinina” con p-valor $< 0,0001$ y “Concentración de citoquinina” con P-valor $< 0,0001$. El factor “Medio basal” no tuvo diferencia significativa (p-valor = 0,9600). Adicionalmente, se encontró diferencia significativa entre la interacción medio basal*citoquinina con P valor $< 0,0001$ y la interacción citoquinina*concentración con p valor $< 0,0001$. Finalmente, se encontró diferencia significativa en la interacción de los 3 factores estudiados (medio basal * citoquinina* concentración) con P valor $< 0,0001$.

Ya que los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis son estadísticamente significativos, se procedió a realizar la prueba de Dunn para la comparación por pares. Se observó que los explantes llegaron a su mayor altura en el control de negativo CN1 (WPM) de $2,20 \pm 0,88$ cm y la segunda mayor altura ($1,82 \pm 0,48$ cm) se consiguió con el tratamiento M7 (AN + 1,0 mg/L ZEA) (Figura 13). La menor altura ($0,84 \pm 0,37$ cm) se obtuvo en el medio M11 (AN + 2,5 mg/L 2iP). Los tratamientos con mayor longitud están suplementados con 1,0 mg/L ZEA, mientras que los tratamientos con menor longitud contenían 2iP. Por tanto, se evidencia que longitud del brote es influenciada por la interacción entre el medio basal y el tipo y concentración de la citoquinina.

Mediante la prueba T ($\alpha = 0,05$), se comparó los resultados obtenidos entre los controles y los tratamientos. Los medios con WPM, presenta diferencias significativas entre el control CN1 y los demás medios ($p < 0,05$). Se observa que existe una disminución en la longitud del explante cuando se adicionan citoquininas a este MB. No se encontraron diferencias significativas entre el medio CN2 y los tratamientos con AN, a excepción del medio M7. Para este medio, se observó un aumento en longitud del explante en comparación con el control.

Figura 12

Longitud de los brotes según la composición del medio de cultivo en la etapa de multiplicación a las 5 semanas de cultivo.



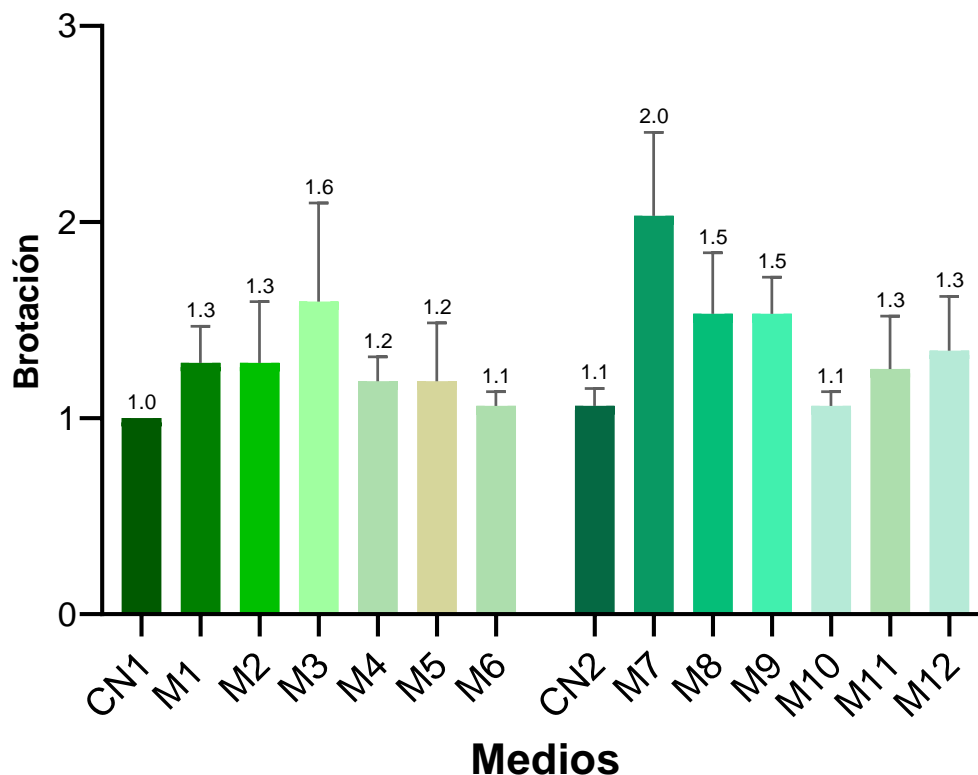
El análisis estadístico de la **brotación** se comenzó realizando la prueba de Shapiro-Wilks, donde el valor P ($<0,0001$) es menor al nivel de significancia (0,05), y por tanto no presentan distribución normal. Con este resultado, se procedió a realizar la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. En este análisis, se observó que existe diferencia significativa en el factor citoquinina (p-valor $< 0,0001$) mientras que el factor medio basal (p-valor = 0,1528) no tiene diferencia significativa. Las interacciones entre dos variables medio basal* citoquinina (p-valor = 0,0003) y citoquinina * concentración (p-valor = 0,0006) también presentan diferencias significativas. Y, la interacción entre las tres variables medio basal * citoquinina * concentración también presenta diferencia significativa (p-valor = 0,0022).

La prueba de Dunn para la comparación de pares indicó que la mayor brotación ($3,34 \pm 3,12$) se realizó con el tratamiento M3 (WPM + 3,0 mg/L ZEA) sin embargo, tiene alta desviación estándar en comparación con los demás tratamientos. A pesar de que M7 presenta la segunda mayor brotación ($2,03 \pm 0,43$), ésta tiene menor desviación estándar y, por tanto, se considera como el mejor medio para esta variable (Figura 13). Adicionalmente, este último medio tiene los mayores valores en cuanto al IM y longitud de brote. Por otro lado, la menor brotación ($1,00 \pm 0,00$) se observa en el CN1, mientras que M6 (WPM + 3,00 mg/L 2iP) es el tratamiento con menor brotación ($1,06 \pm 0,07$). Además, se pudo observar que los medios que contenían ZEA tienen los mayores niveles de brotación, en comparación con 2iP. Esto indica que la brotación está influenciada por la interacción de los tres factores (medio basal *citoquinina*concentración).

Mediante la prueba T ($\alpha = 0,05$), se comparó los resultados obtenidos entre los controles y los tratamientos. Para los medios con WPM, no hay diferencias significativas entre el control CN1 y los demás medios ($p > 0,05$). De igual manera, no se encontraron diferencias significativas entre el medio CN2 y los tratamientos con AN, a excepción del medio M7. Para este medio, se observó un aumento en la Brotación en comparación con el control.

Figura 13

Brotación según la composición del medio de cultivo en la etapa de multiplicación a las 5 semanas de cultivo.



En cuanto al análisis estadístico del **índice de multiplicación (IM)**, se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks, donde el valor P ($<0,0001$) es menor al nivel de significancia (0,05), por lo cual los datos no presentan una distribución normal. Con este resultado, se procedió a realizar la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. En este análisis, se observó que existe diferencia significativa en la citoquinina (p -valor = 0,0137). Los factores medio basal (p -valor = 0,7386) y concentración (p -valor = 0,0512) no tienen diferencia significativa. Las interacciones entre dos variables medio basal*citoquinina y citoquinina* concentración no tienen diferencias significativas. Además, la interacción entre las tres variables medio basal*citoquinina* concentración tampoco presenta diferencia significativa (p -valor = 0,0549). La prueba de Dunn para la comparación de pares indicó que el mayor IM ($2,19 \pm 0,44$) se obtuvo

con CN1 (WPM) y el segundo mayor IM ($1,63 \pm 0,20$) pertenece al medio M7. El menor IM ($1,00 \pm 0,00$) pertenece al medio de M11 (AN + 2,50 mg/L 2iP). Se puede también observar, que existe un mayor IM en los medios que contienen ZEA. (Figura 14)

Mediante la prueba T ($\alpha = 0,05$), se comparó los resultados obtenidos entre los controles y los tratamientos. Para los medios con WPM, no hay diferencias significativas entre el control CN1 y los demás medios ($p > 0,05$), a excepción del medio M4. Para este medio, se observó una disminución significativa en el IM en comparación con el control. De igual manera, no se encontraron diferencias significativas entre el medio CN2 y los tratamientos con AN.

Figura 14

Índice de multiplicación de los brotes según la composición del medio de cultivo en la etapa de multiplicación a las 5 semanas de cultivo.

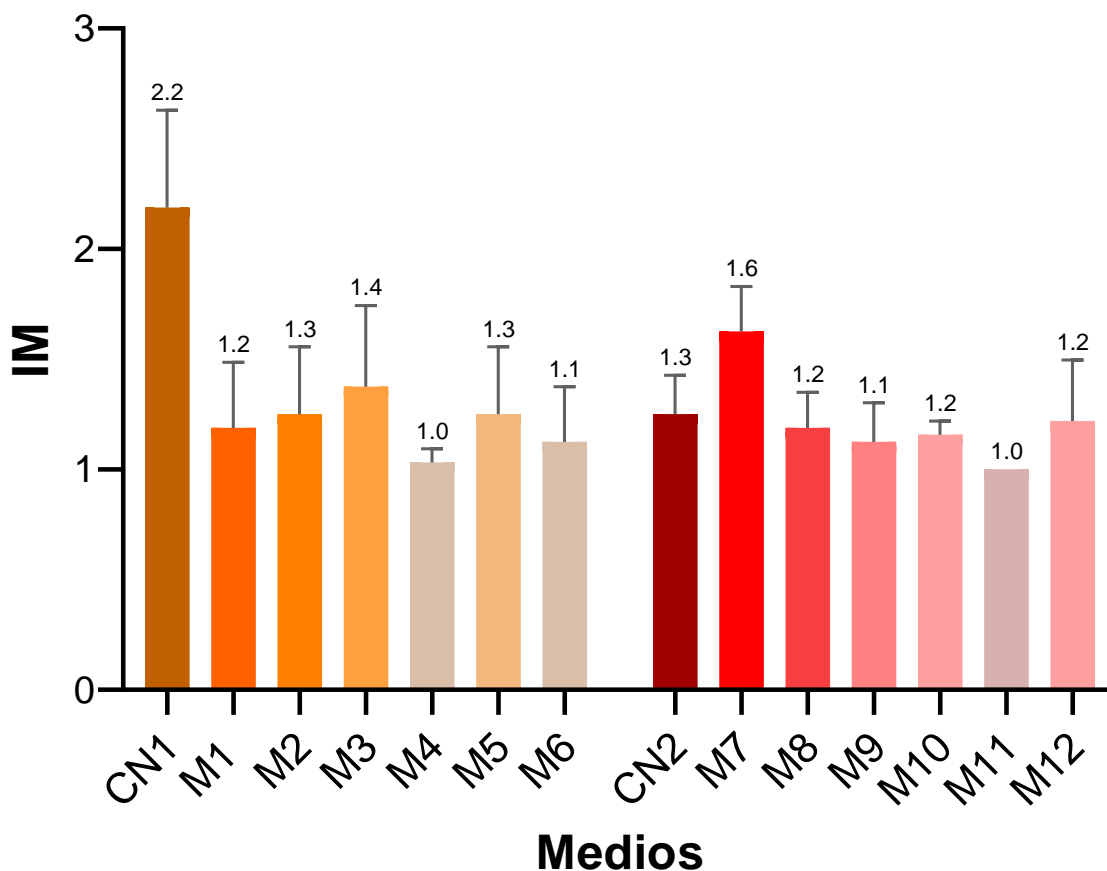


Tabla 6

Resumen de las variables respuesta de los ensayos en la etapa de multiplicación a las 5 semanas de cultivo.

| Código | Medio Basal | Citoquinina | Concentración (mg/L) | % Clorosis | Brotación | IM | Longitud (cm) |
|---------------|--------------------|--------------------|-----------------------------|-------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| CN1 | WPM | 0 | 0,0 | 37,5 | 1,00 ± 0,00 ^A | 2,19 ± 0,44 ^D | 2,20 ± 0,88 ^F |
| M1 | WPM | ZEA | 1,0 | 28,0 | 1,28 ± 0,19 ^{ABCD} | 1,19 ± 0,30 ^{ABC} | 1,19 ± 0,43 ^{BCD} |
| M2 | WPM | ZEA | 2,0 | 86,7 | 1,28 ± 0,31 ^{ABC} | 1,25 ± 0,31 ^{ABCD} | 1,31 ± 0,59 ^{CDE} |
| M3 | WPM | ZEA | 3,0 | 27,8 | 3,34 ± 3,12 ^{CD} | 1,38 ± 0,37 ^{BCD} | 1,53 ± 0,54 ^E |
| M4 | WPM | 2iP | 2,0 | 17,6 | 1,19 ± 0,13 ^{AB} | 1,03 ± 0,06 ^{AB} | 1,05 ± 0,57 ^{AB} |
| M5 | WPM | 2iP | 2,5 | 52,4 | 1,19 ± 0,30 ^{AB} | 1,25 ± 0,31 ^{ABCD} | 1,35 ± 0,44 ^{CDE} |
| M6 | WPM | 2iP | 3,0 | 13,6 | 1,06 ± 0,07 ^A | 1,13 ± 0,25 ^{AB} | 1,24 ± 0,51 ^{BCD} |
| CN2 | AN | 0 | 0,0 | 25,0 | 1,06 ± 0,09 ^{AB} | 1,25 ± 0,18 ^{ABCD} | 1,02 ± 0,63 ^{ABC} |
| M7 | AN | ZEA | 1,0 | 51,7 | 2,03 ± 0,43 ^D | 1,63 ± 0,20 ^{CD} | 1,82 ± 0,48 ^F |
| M8 | AN | ZEA | 2,0 | 47,4 | 1,53 ± 0,31 ^{BCD} | 1,19 ± 0,16 ^{ABCD} | 1,37 ± 0,48 ^{DE} |
| M9 | AN | ZEA | 3,0 | 10,5 | 1,53 ± 0,19 ^{BCD} | 1,13 ± 0,18 ^{AB} | 1,18 ± 0,34 ^{BCD} |
| M10 | AN | 2iP | 2,0 | 64,0 | 1,06 ± 0,07 ^A | 1,16 ± 0,06 ^{ABCD} | 1,24 ± 0,42 ^{BCDE} |
| M11 | AN | 2iP | 2,5 | 66,7 | 1,25 ± 0,27 ^{AB} | 1,00 ± 0,00 ^A | 0,84 ± 0,37 ^A |
| M12 | AN | 2iP | 3,0 | 37,5 | 1,34 ± 0,28 ^{ABCD} | 1,22 ± 0,28 ^{ABCD} | 1,46 ± 0,44 ^E |

Nota. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Considerando las variables antes descritas, se puede concluir que la formulación que presenta los mejores resultados para la etapa de multiplicación de brotes es el tratamiento M7, con medio basal AN suplementado con 1 mg/L ZEA. El segundo medio con mejor desempeño fue el M3 (WPM + 3,00 mg/L ZEA), presenta la mayor brotación y el segundo mayor IM y longitud más altos. Ambos tratamientos fueron seleccionados para ser evaluados en el segundo ensayo de multiplicación.

Segundo ensayo: Evaluación la presencia de IBA en medios de multiplicación

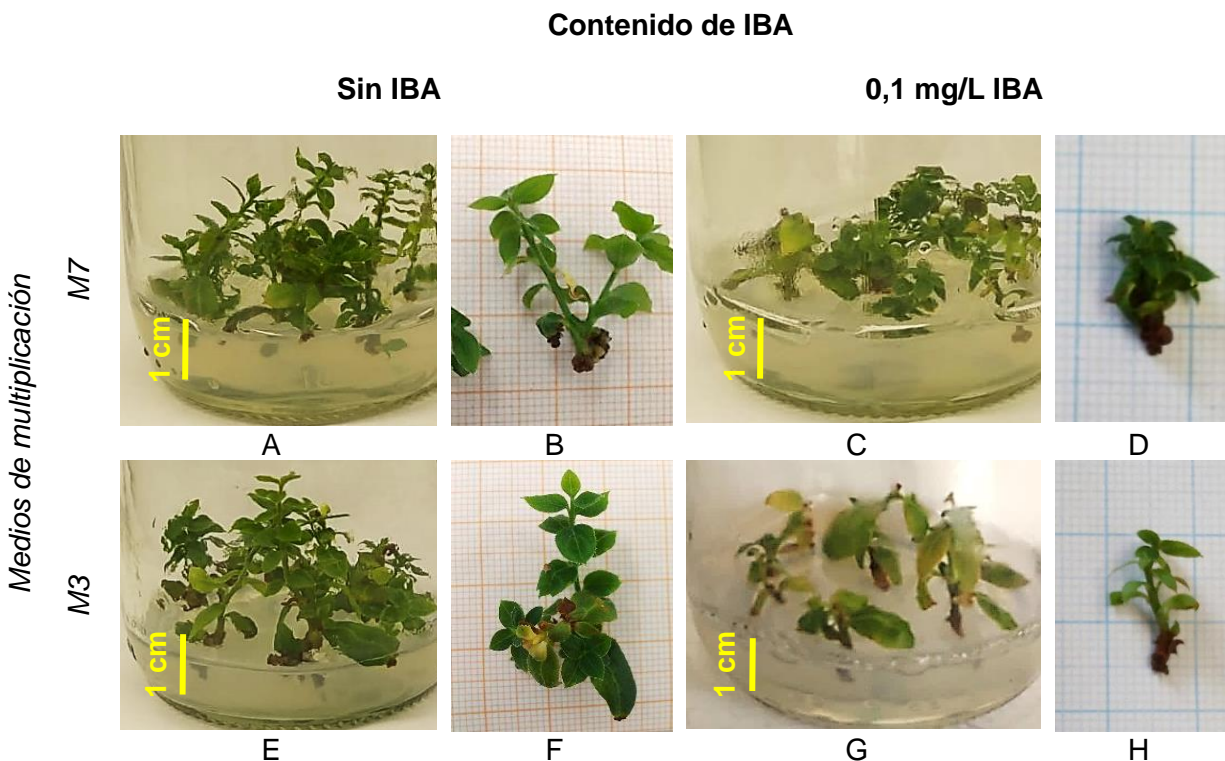
En el segundo ensayo se usaron los tratamientos M7 y M3, para evaluar los efectos de la presencia de 0,1 mg/L de IBA en la longitud de brote, la brotación e índice de multiplicación (Tabla X). Y, se consideró a estos tratamientos como el control.

Durante este ensayo se compararon dos tratamientos antes y después de adicionar 0,1 mg/L IBA. Primero, el tratamiento de AN con 1 mg/mL de ZEA y 0,1 mg/mL IBA (M7+IBA) y luego el medio con WPM suplementado con 3 mg/L ZEA. Los resultados fueron obtenidos a las 5 semanas de cultivo donde se evalúa el porcentaje de clorosis, brotación, IM y longitud de brotes (Tabla 7).

Pasado este periodo, se observó la formación de callos de color verde en las hojas que entraron en contacto con el medio de cultivo M7+IBA. En contraste, el tratamiento M3+IBA no formaron callos en las hojas que entraron en contacto con el medio. También se pudo observar síntomas de clorosis cerca del ápice, indicando baja absorción de nitrógeno. El mayor porcentaje de clorosis (69,12 %) se encontró en el medio M7+IBA, mientras que el medio M3+IBA presentó un menor porcentaje (38,33 %) (Figura 16).

Figura 15

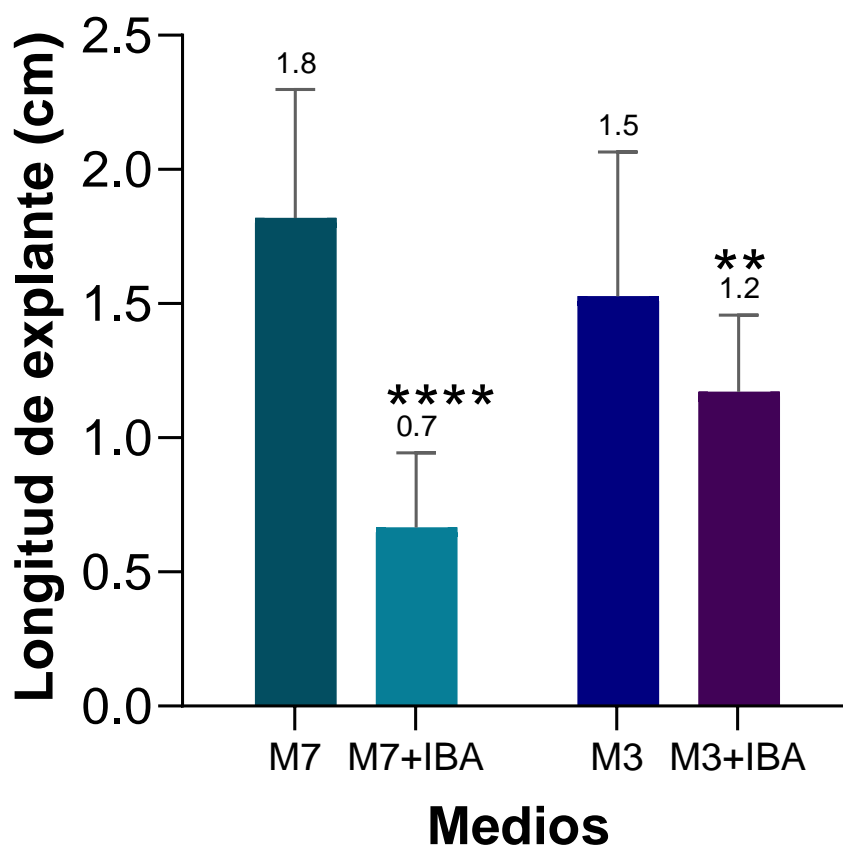
Explantes del ensayo de evaluación de medios basales con citoquininas a las 5 semanas del tratamiento.



Para realizar la comparación de medias de la **longitud de los explantes** entre M7 y M7+IBA, se realizó prueba T no pareada. Para ello, se asumió la normalidad de los datos. La prueba T indicó que existe una diferencia significativa entre ambos tratamientos obteniendo un p-valor $<0,0001$, menor al nivel de significancia (0,05). La media del tratamiento M7 (1,82 cm) fue mayor a la media de M7+IBA (0,67 cm) con una diferencia de $-1,15 \pm 0,10$ cm. Por otro lado, se compararon las medias entre M3 y M3+IBA, mediante la prueba T. Esta indicó que existe una diferencia significativa entre los tratamientos con un p-valor 0,0015, el cual es menor al nivel de significancia (0,05). La media del tratamiento M3 es 1,53 cm y es mayor a la media M3+IBA de 1,17 cm. La diferencia de medias entre ambas es de $0,36 \pm 0,11$ cm (Figura 16).

Figura 16

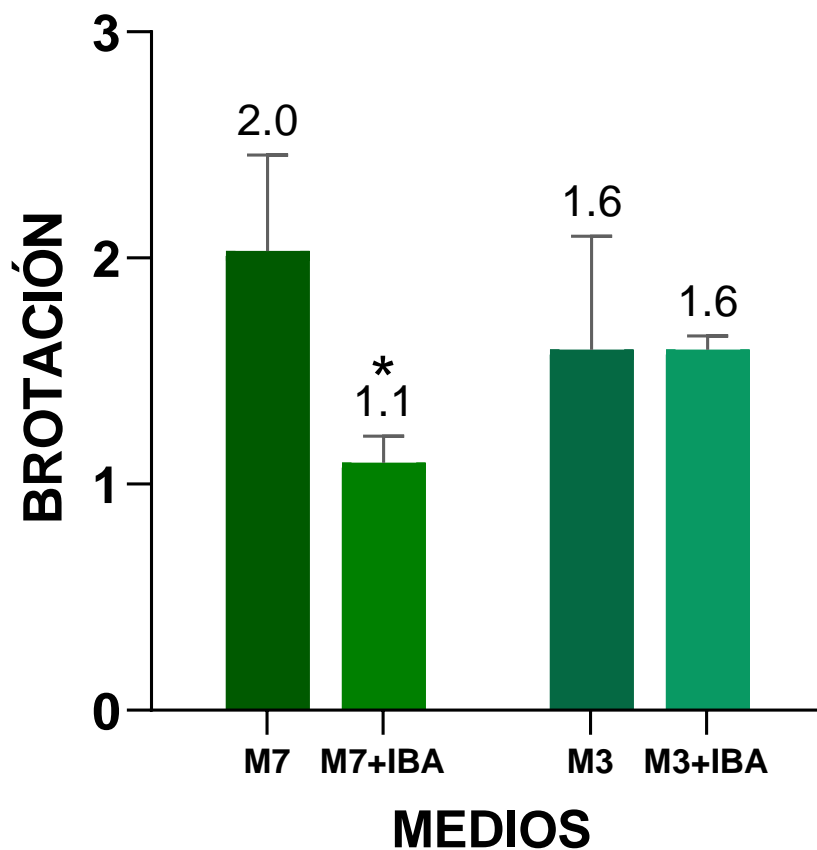
Comparación entre las medias de la longitud de explantes entre los tratamientos con y sin IBA en la etapa de multiplicación a las 5 semanas de cultivo



También, se evaluó la **brotación** entre los tratamientos para ello se realizó la prueba T no pareada. La prueba indicó que existe una diferencia significativa entre ambos tratamientos obteniendo un p-valor 0,0054, que es menor al nivel de significancia (0,05). La media del tratamiento M7 (2,031) fue mayor a la media de M7+IBA (1,09) con una diferencia de $0,94 \pm 0,22$ cm. En contraste, la comparación entre medias de M3 y M3+IBA no presentó diferencia significativa con un p valor $>0,9999$ que es mayor al nivel de significancia. Las medias para ambos tratamientos fueron de 1,594 (Figura 17).

Figura 17

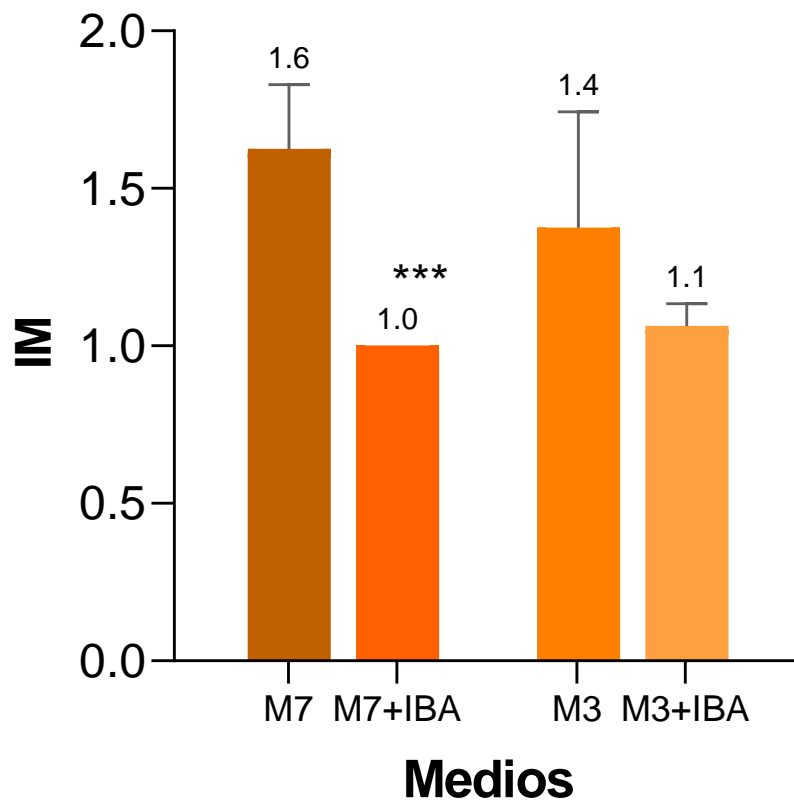
Comparación entre las medias de la brotación entre los tratamientos con y sin IBA en la etapa de multiplicación a las 5 semanas de cultivo



También se realizó la evaluación de la **Índice de multiplicación (IM)**, entre M7 y M7+IBA mediante una prueba T no pareada. Para ello, se asumió la normalidad de los datos. La prueba T indicó que existe una diferencia significativa entre ambos tratamientos obteniendo un p-valor 0,0009, que es menor al nivel de significancia (0,05). La media del tratamiento M7 (1,63) fue mayor a la media de M7+IBA (1,00) con una diferencia de $0,63 \pm 0,10$ cm. Por otro lado, se compararon las medias entre M3 y M3+IBA usando la prueba T. Esta indicó que no existe una diferencia significativa entre los tratamientos con un p-valor 0,1466, el cual es mayor al nivel de significancia (0,05). La media del tratamiento M3 es 1,38 cm y es mayor a la media M3+IBA de 1,06 cm. La diferencia de medias entre ambas es de $-0,31 \pm 0,19$ cm (Figura 18).

Figura 18

Comparación entre las medias del IM entre los tratamientos con y sin IBA en la etapa de multiplicación a las 5 semanas de cultivo



En base a los resultados obtenidos, se puede concluir que la adición de 0,01 mg/L de IBA tiene un efecto en el desarrollo del cultivo. La adición de IBA aumenta la presencia de síntomas de clorosis en los explantes. Por otro lado, el análisis estadístico demostró que adicionar la auxina al medio M7, disminuye de manera significativa la longitud del explante, la brotación y el IM. En contraste, la adición de la auxina en el medio M3, solo afecta significativamente la longitud del explante. En conclusión, la adición de IBA en los medios disminuye el desempeño del tratamiento en la etapa de multiplicación.

Tabla 7

Resumen de las variables respuesta en la para la etapa de multiplicación del segundo ensayo.

| Variabes | M7 | M7+IBA | M3 | M3+IBA |
|-----------------|-----------|---------------|-----------|---------------|
| % Clorosis | 51,7 | 69,12 | 13,6 | 38,33 |
| Brotación | 2,03 | 1,09 ** | 1,59 | 1,59 |
| IM | 1,63 | 1,00 *** | 1,38 | 1,06 |
| Altura (cm) | 1,82 | 0,67 **** | 1,53 | 1,17 ** |

Capítulo V: Discusión

Medio de cultivo para inducción de brotes

La inducción a brotes en el cultivo *in vitro* es un punto crítico, ya que los explantes deben adaptarse a condiciones del medio. Uno de los pasos más importantes es determinar los reguladores de crecimiento adecuado y el medio basal (Schuchovski & Biasi, 2019). El resultado en este ensayo, presentó el efecto de dos medios basales y su influencia con dos citoquininas en dos concentraciones diferentes.

Los resultados demostraron que el tipo de citoquinina suplementada en el medio tiene influencia en la inducción a brotes de microestacas de arándano. Se observó que en los tratamientos con ZEA el porcentaje de brotación es más alto que aquellos suplementados con 2iP. La estimulación influenciada por ZEA está en concordancia con otros autores como Ostrolucká et al. (2004), que obtuvo la mejor habilidad de regeneración de brotes con 2 mg/L de ZEA en *V. corymbosum* L cvs. “Berkeley”, “Bluecrop”, “Blueray”, “Duke” y “Brigitta”. De igual manera, la ZEA ha probado ser más efectiva para la iniciación de brotes en las especies de *Vaccinium* (Debnath, 2007). Autores como Cüce & Sökmen (2017) y Lerma et al. (2019), también determinaron que la ZEA induce a una mayor brotación en comparación que 2iP. Por otro lado, la variable longitud de brotes hubo una diferencia significativa entre los tratamientos. En los medios suplementados con ZEA tuvieron las longitudes más altas que concuerdan con las conclusiones de Lerma et al. (2019), donde se encontró que medios con 3,0 o 2,0 mg/L ZEA hubo mayor altura de brotes (media de 3,1 cm).

También se pudo encontrar diferencias significativas entre los medios basales, donde los tratamientos con WPM tuvieron mejor rendimiento que aquellos con AN. Esto se debe a que el WPM fue desarrollado para especies de la familia *Ericaceae* y actualmente es usada para la propagación de arándano (Wolfe et al., 1983). En este estudio se obtuvo el mayor % brotación (55,8 %), IM (2,30) y longitud de explantes (2,1 cm) en el tratamiento I4 (WPM + 2 mg/L ZEA) (Tabla 5). Este resultado concuerda con Mohamed et al. (2018), donde encontraron que los medios con WPM sin citoquinina provocaron mayor longitud de en brotes axilares en *V. corymbosum* L. cv "Sunt Blue Giant". También se observó resultados similares medios con WPM fortificados con 1,0 y 2,0 mg/L ZEA y 0,1 mg/L IBA (Mohamed et al., 2018).

Fase de Multiplicación

Primer ensayo: Evaluación de medios basales con citoquininas

Los resultados demostraron que el medio M7 con AN y suplementado con 1,0 mg/L ZEA fue el óptimo para la multiplicación *in vitro* ya que presentó los mayores índices en el porcentaje de brotación, IM y longitud de brote. El análisis estadístico indicó que la interacción entre el medio basal, la citoquinina y su concentración, tuvieron una influencia significativa en el desarrollo de los explantes. Esto se confirma con los resultados obtenidos por Ostrolucká et al (2004), que indican la importancia de la composición del medio de cultivo en la diferenciación de brotes (Tabla 6).

Por otro lado, los medios basales no tuvieron diferencia significativa en ninguna de las variables de respuesta durante la etapa de multiplicación. Esto está de acuerdo con el trabajo de Wolfe et al. (1983) donde el desarrollo del brote no fue estadísticamente diferente en los 4 medios basales estudiados (WPM, MMS, Z-3, ½ MS) durante la multiplicación del arándano alto variedad "Bluecrop". Por su lado, M. G. Ostrolucká et al. (2007) regeneraron brotes

múltiples y vigorosos de manera efectiva usando un medio AN suplementado con bajas concentraciones de ZEA (0,5 mg/L).

Este estudio confirmó que el tipo de citoquinina influye de manera significativa en la longitud del explante, la brotación y el IM (Debnath, 2004; Mária Gabriela Ostrolucká et al., 2004). Los resultados indican que los medios con ZEA fueron más efectivos que aquellos suplementados con 2iP. Los resultados de Ostrolucká et al. (2004) demostraron que los tratamientos con 2iP, tuvieron menor IM (1.02 - 3.80) que aquellos suplementados con ZEA. En comparación, Lerma et al. (2019) los medios con 2 mg/L ZEA tuvieron mayor longitud de brotes pero menor brotación en *V. corymbosum* cv Biloxi. Esto puede explicarse ya que la producción de brotes es altamente dependiente del cultivar y la concentración de citoquininas (M. Ostrolucká et al., 2004).

Adicionalmente, se observó que varios de los explantes poseían síntomas de clorosis ya que presentaron coloración amarilla en las hojas superiores principalmente en el medio M2 (WPM + 2mg/L ZEA). De igual manera se observaron que muchos de los brotes eran de color verde amarillento con coloración rojiza en los filos de las hojas. En la investigación de Tetsumura et al. (2008) también se observó coloración rojiza en las hojas en brotes cultivados en WPM. Ellos relacionaron este síntoma con deficiencia de nitrógeno. Sin embargo, en la publicación de Ružić et al. (2012) también se observaron estos síntomas en brotes cultivados en MS, el cual posee 4 veces más nitrógeno que el WPM. Un aspecto importante es que el color de los brotes varían con cada cultivar y no es dependiente del medio: el arándano alto del sur "O' Neal" fueron verdes, el 80% de los brotes de las variedades de arándano alto del norte "Bluecrop" y "Earliblue" fueron de verde amarillento, mientras que los brotes de "Berkeley" fueron rojos (Tetsumura et al., 2008).

La ZEA ha demostrado ser una hormona eficiente para estimular el crecimiento de brotes, incrementar el índice de multiplicación (IM), propagar diferentes cultivares y reducir los tiempos de propagación por múltiples autores (Mohamed et al., 2018). Sin embargo, debido al

alto costo económico su uso es restringido en proceso masificación (Reed & Abdelnour-Esquivel, 2019).

Segundo ensayo: Evaluación la presencia de IBA en medios de multiplicación

Los medios M7 (AN + 1,0 mg/L ZEA) y M3 (WPM + 3,0 mgL ZEA) fueron los tratamientos óptimos para la multiplicación. Al añadir 0,1 mg/L de IBA, el rendimiento de los tratamientos disminuyó significativamente (Tabla 7) y se formaron brotes de baja calidad. En contraste, Mohamed et al. (2018) encontró que el medio óptimo para la proliferación de brotes en la *V. corymbosum* cv. "Sunt Blue Giant" fue WPM suplementado con 1,0 mg/L ZEA y 0,1mg/L IBA. Asimismo, Wojciech Litwińczuk & Wadas (2008) encontraron que la presencia de IBA facilita la micropropagación mediante brotes axilares del arándano alto variedad "Herbert". Ružić et al. (2012) encontró que al añadir 0,1 - 1,0 mg/L de IBA los brotes tienen un buen desarrollo y un mayor IM, que aquellos medios que sólo contenían ZEA. De esta manera concluyeron que las bajas concentraciones de IBA (≤ 1 mg/L) facilitan la micropropagación de tres cultivares de arándano alto (Ružić et al., 2012).

En los resultados se observó que en los medios con 0,1 mg/L IBA hubo un aumento en la presencia de síntomas de clorosis, gran formación de callo en la base y se observó la necrosis de los ápices. Estos mismos síntomas fueron reportados por Ružić et al. (2012) pero en concentraciones mas altas de IBA (5,0 mg/L). Además, los datos obtenidos en el presente estudio demostraron la disminución en la viabilidad de los explantes en medios que contenían IBA (M7 + IBA y M3 + IBA). En concordancia con los presentes resultados, Litwińczuk & Wadas-Boroń (2009) reportaron que el 30% de explantes que crecieron con IBA murieron o formaron grandes callos. Es así que concluyeron que IBA disminuye la proliferación de brotes axilares y por consiguiente, disminuye la eficiencia de micropropagación (W. Litwińczuk & Wadas-Boroń, 2009; Wojciech Litwińczuk & Wadas, 2008).

Capítulo VI: Conclusiones

La propagación de *in vitro* de *V. corymbosum* tiene gran potencial para cubrir con la demanda de material vegetal del mercado ecuatoriano. Se evaluó el efecto de los medios basales y diferentes concentraciones de citoquininas en la inducción a brotes de segmentos nodales en un cultivar de arándano alto del sur. Se determinó que tanto el medio basal como el tipo y concentración de citoquina, tienen una influencia significativa en la inducción a brotes. Otro factor determinante en la inducción a brotes es el tipo de citoquinina suplementada. Se concluyó que la ZEA es más efectiva. Finalmente, la inducción a brotes fue más eficiente en el medio basal WPM suplementado con 2,0 mg/L ZEA y presenta el mayor porcentaje de brotación (63,5 %), índice de multiplicación (2,60) y la segunda longitud más alta (2,2 cm).

Durante la fase de multiplicación *in vitro* se demostró que también existe una interacción entre los medios basales, tipo de citoquininas y su concentración. Particularmente, el tipo de citoquinina tuvo una influencia significativa en las variables de respuesta. Se corroboró que ZEA es más eficiente que 2iP. Se determinó que el medio con AN suplementado con 1,0 mg/L ZEA permite la brotación de yemas axilares, incrementa la longitud de brotes y aumenta el índice de multiplicación. Este medio presenta la mayor longitud de explantes (1,02 cm), la mayor brotación (3,34), el mayor índice de multiplicación (1,82).

Finalmente, se observó que la presencia de 0,1 mg/L IBA afecta significativamente la proliferación de brotes y disminuye de manera significativa la eficiencia de los medios de multiplicación. Los medios suplementados con la auxina disminuyen la brotación de yemas axilares, el índice de multiplicación y la altura de los explantes, en comparación con los medios suplementados sólo con ZEA. La presencia de IBA forma explantes de baja calidad y aumenta los síntomas de clorosis en los brotes del cultivar de arándano alto del sur objeto del presente estudio.

Capítulo VII: Recomendaciones

Determinado el medio de cultivo usado en la fase de multiplicación, es necesario evaluar otros factores requeridos para propagar de manera masiva los brotes *in vitro* como: la densidad de explantes y el volumen de medio usado para su cultivo.

Se sugiere evaluar las fuentes de hierro (Fe) y nitrógeno (N) en el medio basal para optimizar el desarrollo de brotes *in vitro* y disminuir los síntomas de clorosis.

Investigaciones futuras podrían determinar la auxina requerida para la elongación de brotes u optimización la concentración del IBA implementada en los medios de multiplicación.

Con el fin de disminuir el tiempo de micropropagación, se puede investigar formulaciones de medios que permitan la multiplicación de brotes al mismo tiempo que se induzcan la formación de raíces. De esta manera se puede establecer un protocolo para la propagación de la variedad de arándano alto del sur (*V. corymbosum*) en un solo paso.

Bibliografía

- Antama, F. (2017). *La hormona vegetal citoquinina regula el crecimiento y desarrollo de las plantas*. Fundación Antama. <https://fundacion-antama.org/la-hormona-vegetal-citoquinina-regula-el-crecimiento-y-desarrollo-de-las-plantas/>
- Aquije, J. (2020). Establecimiento in vitro de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) -variedad Biloxi. *Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano*, 22. <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/6832/1/CPA-2020-T010.pdf>
- Bhatia, S., Sharma, K., Dahiya, R., & Tanmoy, B. (2015). Micropropagation. In *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences* (pp. 361–332). <https://doi.org/10.1201/b17338-47>
- BioPlan. (2019). *Bioplan In vitro*. BioPlan. <http://www.bioplaninvitro.com>
- Britannica, T. E. of E. (2023). *Blueberry*. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/plant/blueberry-plant>
- Cao, X., Fordham, I., Douglass, L., & Hammerschlag, F. (2003). *Cao et al, 2003. Niveles sacarosa blueberry.pdf*. 255–259.
- Castro, A. (2016). Mejora de la propagación in vitro de *Vaccinium corymbosum* y evaluación de la actividad antioxidante en arándanos comerciales. *Máster En Biología Molecular, Celular y Genética.*, 40. http://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/17519/CastroFernandez_AnaMaria_TFM_2016.pdf?sequence=2
- Cayo, N., & Peralta, E. (2021). Propagación In Vitro del cultivo de arándano (*Vaccinium corymbosum* L) en e cantón Cevallos provincia Tungurahua. *Universidad Técnica de Cotopaxi*, 1, 101. <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/4501/1/PI-000727.pdf>
- Chimdessa, E., & Agricultural, O. (2020). Composition and Preparation of Plant Tissue Culture Medium. *Journal of Tissue Culture and Bioengineering*, 3(01). <https://doi.org/10.29011/2688-6502.000020>

- Cüce, M., & Sökmen, A. (2017). In vitro production protocol of *Vaccinium uliginosum* L. (bog bilberry) growing in the Turkish flora. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 41(4), 294–304. <https://doi.org/10.3906/tar-1704-19>
- Daorden, M. (2008). Cultivo in Vitro De Tejidos Vegetales. *Exposicion-Estacion Experimental Agropecuria San Pedro*, 69. https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-md_0701.pdf
- Debnath, S. C. (2004). In vitro culture of lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.). *Small Fruits Review*, 3(3–4), 393–408. https://doi.org/10.1300/J301v03n03_16
- Debnath, S. C. (2007). Propagation of *Vaccinium* in vitro: A Review. *International Journal of Fruit Science*, 6(2), 47–71. https://doi.org/10.1300/J492v06n02_04
- Edger, P. P., Iorizzo, M., Bassil, N. V., Benevenuto, J., Ferrão, L. F. V., Giongo, L., Hummer, K., Lawas, L. M. F., Leisner, C. P., Li, C., Munoz, P. R., Ashrafi, H., Atucha, A., Babiker, E. M., Canales, E., Chagne, D., Devetter, L., Ehlenfeldt, M., Espley, R. V., ... Zalapa, J. (2022). There and back again; historical perspective and future directions for *Vaccinium* breeding and research studies. *Horticulture Research*, 9(January). <https://doi.org/10.1093/hr/uhac083>
- Espinosa-Leal, C. A., Puente-Garza, C. A., & García-Lara, S. (2018). In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*, 248(1), 1–18. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1>
- Fepexa. (2023). *Arándano*. Arándano. <https://www.fepexa.org.ec>
- Gajdošová, A., Ostrolucká, M. G., Libiaková, G., Ondrušková, E., & Šimala, D. (2006). Microclonal propagation of *Vaccinium* sp. and *Rubus* sp. and detection of genetic variability in culture in vitro. *J Fruit Ornament Plant Res*, 14(Suppl. 1), 103–119. <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=17943372%5Cnpapers3://publication/uuid/7AC09504-48E0-435F-B8E2-7067BB3A06BF>
- Hine, A., & Abdelnour, A. (2013). Establecimiento in vitro de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.). *Revista Tecnología En Marcha*, 26(4), 64. <https://doi.org/10.18845/tm.v26i4.1584>

- Iliev, I. A. (2017). Factors affecting the axillary and adventitious shoot formation in woody plants in vitro. *Acta Horticulturae*, 1155, 15–27. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1155.2>
- Jaakola, L., Tolvanen, A., Laine, K., & Hohtola, A. (2001). Effect of N6-isopentenyladenine concentration on growth initiation in vitro and rooting of bilberry and lingonberry microshoots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 66(1), 73–77. <https://doi.org/10.1023/A:1010602726215>
- Jiménez-Bonilla, V., & Abdelnour-Esquivel, A. (2018). Protocolo de micropropagación de arándano nativo de Costa Rica (*Vaccinium consanguinium*). *Revista Tecnología En Marcha*, 31(1), 146. <https://doi.org/10.18845/tm.v31i1.3504>
- Jiménez, P., Barrera Aguilar, P., Huachi Espín, L. E., Vera Zambrano, A., & Caicedo Vargas, C. (2020). Propagation In Vitro Of Qusihuar (*Buddleja incana* Ruíz & Pav). *La Granja*, 31(1). <https://doi.org/https://doi.org/10.17163/lgr.n31.2020.05>
- Jordán, M., & Casaretto, J. (2006). Hormonas y Reguladores del Crecimiento : Auxinas , Giberelinas y Citocininas. In *Fisiología Vegetal* (pp. 1–28). Universidad de La Serena. <https://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Auxinasgiberelinasycitocininas.pdf>
- Kwantlen Polytechnic University. (2015). *Vaccinium corymbosum*. KWANTLEN POLYTECHNIC UNIVERSITY. <https://plantdatabase.kpu.ca/plant/plantDetail/1149>
- Lambardi, M., National, I., & Jain, S. M. (2013). *Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants* (Vol. 994, Issue January 2012). <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-074-8>
- Lerma, S., García, D., Fandiño, W., & Díaz, W. (2019). Propagación in vitro de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) a partir de yemas axilares. *Centro de Biotecnología Agropecuaria, Propagación in vitro de arándano (Vaccinium corymbosum L.) a partir de yemas axilares.*, 11. [file:///C:/Users/lesli/AppData/Local/Temp/3547-Texto del artículo-16433-1-10-20201220\(1\).pdf](file:///C:/Users/lesli/AppData/Local/Temp/3547-Texto del artículo-16433-1-10-20201220(1).pdf)
- Litwińczuk, W., & Wadas-Boroń, M. (2009). Development of highbush blueberry (*Vaccinium*

corymbosum hort. non L.) in vitro shoot cultures under the influence of melatonin. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*, 8(3), 3–12.

Litwińczuk, Wojciech, & Wadas, M. (2008). Auxin-dependent development and habituation of highbush blueberry (*Vaccinium × covilleianum* But. et Pl.) “Herbert” in vitro shoot cultures. *Scientia Horticulturae*, 119(1), 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.07.007>

Meléndez-Jácome, M. R., Flor-Romero, L. E., Sandoval-Pacheco, M. E., Vasquez-Castillo, W. A., & Racines-Oliva, M. A. (2021). *Vaccinium* spp.: Karyotypic and phylogenetic characteristics, nutritional composition, edaphoclimatic conditions, biotic factors and beneficial microorganisms in the rhizosphere. *Scientia Agropecuaria*, 12(1), 109–120. <https://doi.org/10.17268/SCI.AGROPECU.2021.013>

Mohamed, G., Khusnetdinova, L., & Timofeeva, O. (2018). Elaboration of Micropropagation Protocol for *Vaccinium corymbosum* cv. “Sunt Blue Giant.” *Pelagia Research Library Asian Journal of Plant Science and Research*, 8(5), 1–11. www.pelagiaresearchlibrary.com

Ostrolucká, M. G., Gajdošová, A., Libiaková, G., Hrubíková, K., & Bežo, M. (2007). Protocol for micropropagation of selected *Vaccinium* spp. *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*, 445–455. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6352-7_41

Ostrolucká, M., Gajdošová, A., Ondrušková, E., & Libiaková, G. (2004). *IN VITRO PROPAGATION OF SEVERAL VACCINIUM CORYMBOSUM L. AND Kopsavilkums Šaj ā rakst ā ir apskat ī ta efekt ī va in vitro re ā ener ā cijas un pavairošanas sist ē ma vair ā k ā m Vaccinium*. 75–80.

Ostrolucká, Mária Gabriela, Libiaková, G., Ondrušková, E., & Gajdošová, A. (2004). In vitro propagation of *Vaccinium* species. *Acta Universitatis Latviensis, Biology*, 676(November 2014), 207–212. <https://www.researchgate.net/publication/267372943>

Padmanabhan, P., Correa-Betanzo, J., & Paliyath, G. (2015). Berries and Related Fruits. In *Encyclopedia of Food and Health* (1st ed.). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00060-X>

- Pelacho, A., Martín, L., & Sanfeliu, J. (2005). *Medios*. Universidad de Lleida.
<http://cv.udl.cat/cursos/76304/t5/t5.htm>
- Phillips, G. C., & Garda, M. (2019). Plant tissue culture media and practices: an overview. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 55(3), 242–257.
<https://doi.org/10.1007/s11627-019-09983-5>
- Primicias, R. (2022). *Ecuador exportó cinco toneladas de arándanos a Países Bajos*. Primicias.
<https://www.primicias.ec/noticias/economia/ecuador-exportacion-arandanos-paises-bajos/>
- Quiñones. (2007). Universidad Austral de Chile. *In Vitro*, 3, 1–23.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/myaccess.library.utoronto.ca/pubmed/11720961>
- Read, P. E., & Preece, J. E. (2014). Cloning: Plants - Micropropagation/Tissue Culture. In *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems* (Vol. 2). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52512-3.00224-2>
- Reed, B. M., & Abdelnour-Esquivel, A. (2019). The Use of Zeatin to Initiate in Vitro Cultures of Vaccinium Species and Cultivars. *HortScience*, 26(10), 1320–1322.
<https://doi.org/10.21273/hortsci.26.10.1320>
- Ružić, D., Vujović, T., Libiakova, G., Cerović, R., & Gajdošova, A. (2012). Micropropagation in vitro of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of Berry Research*, 2(2), 97–103. <https://doi.org/10.3233/JBR-2012-030>
- Schuchovski, C. S., & Biasi, L. A. (2019). In vitro establishment of ‘delite’ rabbiteye blueberry microshoots. *Horticulturae*, 5(1). <https://doi.org/10.3390/horticulturae5010024>
- Tejada, J. J., Meléndez, J. B., Vilca, N. C., Huaman, E., Lapid, Y. K., Neri, J. C., Prat, M. L., & Oliva, M. (2022). Optimizing factors influencing micropropagation of “Bluecrop” and “Biloxi” blueberries and evaluation of their morpho-physiological characteristics during ex vitro acclimatization. *Journal of Berry Research*, 12(3), 347–364. <https://doi.org/10.3233/JBR-211565>
- Tetsumura, T., Matsumoto, Y., Sato, M., Honsho, C., Yamashita, K., Komatsu, H., Sugimoto, Y., &

Kunitake, H. (2008). Evaluation of basal media for micropropagation of four highbush blueberry cultivars. *Scientia Horticulturae*, 119(1), 72–74.

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.06.028>

Undurraga, P., & Vargas, S. (2013). Manual de arandanos. Boletín IIA N° 263. *Instituto de Investigaciones Agropecuarias*, 263(Manejo de enfermedades en arándano), 120.

<https://biblioteca.inia.cl/handle/123456789/7627>

Universo, E. (2022). Ecuador exportó cinco toneladas de arándanos a Países Bajos. *El Universo*.

<https://www.eluniverso.com/noticias/economia/ecuador-exporto-cinco-toneladas-de-arandanos-a-paises-bajos-nota/>

Wolfe, D. E., Eck, P., & Chin, C.-K. (1983). Evaluation of Seven Media for Micropropagation of Highbush Blueberry. *HortScience*, 18(5), 703–705.

<https://doi.org/10.21273/hortsci.18.5.703>

Zapién, M., & Esteves, E. (2021). *Arándanos: gran potencial para exportación*. Maíz y Soya.

<https://www.maizysoya.com/lector.php?id=20200828>