

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES

El cultivo del arándano se proyecta como uno de los más sostenibles para la macro región de los valles del departamento de Tarija.

El arándano es de origen americano y su distribución abarca a todos los continentes del mundo especialmente en las zonas templadas; entre los países vecinos que son productores de este cultivo están Chile siendo el mayor productor de Sud América seguido de Argentina, en nuestro país este cultivo está tomando importancia y los departamentos productores son Cochabamba, Santa Cruz, Chuquisaca y con mayor producción en el departamento de Tarija en las zonas del valle central y en la provincia O'Connor .

El arándano es una planta muy importante para los productores debido a la alta rentabilidad de la fruta, esta es comercializa en los mercados, supermercados y tiendas privadas, no sólo el fruto es atrayente como actividad económica sino también es una producción que cuida el medio ambiente protegiendo al suelo de la erosión y contribuye a la formación de humus.

En estos últimos tiempos se vio que el Arándano, como tal puede ser una alternativa muy importante a la producción agrícola del departamento de Tarija, pero al ser un cultivo de alta rentabilidad también requiere de condiciones y labores culturales necesarias para que esta planta se desenvuelva de forma óptima con los mejores rendimientos en la producción para así obtener mejores beneficios económicos a los productores.

1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De todos los problemas a tratar como ser: suelo, temperatura, altitud, horas frío, pH, riego, exposición, etc. el principal es la multiplicación.

En la multiplicación los plantines deberán estar en las mejores condiciones posibles para su implantación en el terreno existiendo dos formas de propagación:

Propagación Sexual.- Esta propagación no es utilizada para la producción de fruto del Arándano para su comercialización, ya que esta forma de propagación sólo es utilizada para el mejoramiento de las variedades,

Propagación asexual.- Ésta es la técnica que se produce para producir plantines de arándano es a través de esquejes.

1.3. JUSTIFICACION

Este trabajo de investigación busca una alternativa para la multiplicación, por medio de la técnica de cultivo *in vitro*, para la producción de plantines a partir de segmentos nodales donde se encuentran las células meristemáticas tomando en cuenta como una especie para la producción de Arándano ya que ésta tiene muchas ventajas nutritivas y de gran importancia económica.

El cultivo *in vitro*, es el cultivo de organismos vivos en medios estériles, en condiciones asépticas de laboratorio, dotándole al material vivo todos los requerimientos nutricionales, en la que a partir de un pequeño segmento inicial de tejido es posible regenerar en poco tiempo miles o millones de plantas genéticamente iguales a la planta madre, conservando la variedad deseada.

Tiene ciertas ventajas como ser: producir plantas en cualquier época del año, plantas libres de enfermedades, permite obtener un banco de germoplasma y realizar la multiplicación en menor tiempo.

Un tema de mucha importancia entre los productores es la adquisición de plantines debido a los problemas existentes en su multiplicación.

Este trabajo busca encontrar mejores posibilidades para la multiplicación, por medio de la técnica de cultivo *in vitro* presenta ventajas como ser: producir plantas en cualquier época del año, plantas libres de enfermedades, permite obtener un banco de germoplasma y realizar la multiplicación en menor tiempo y de mejor calidad genética, para poder obtener información que sirva a los productores e investigadores que buscan generar una alta producción la cual tenga beneficios económicos y sociales.

Con la técnica de cultivo *in vitro* se producen plantines de arándano, de mejor calidad y en menor tiempo.

Hasta el momento, no se tiene conocimiento en nuestra universidad sobre trabajos de investigación públicos, que hayan sido estos mismos publicados por alguna institución ya sea gubernamental o no, acerca de resultados en cualquiera de las fases de la técnica de cultivo *in vitro* en el cultivo de arándano.

Ante el panorama descrito es de suma importancia, contribuir con datos más precisos para multiplicar plantas mediante cultivo *in vitro* para que ésta fuera usada a futuro para posteriores investigaciones.

1.4. HIPÓTESIS DEL TRABAJO

Para el presente trabajo se plantea la siguiente hipótesis:

1.4.1. Hipótesis Alternativa

- El método de cultivo *in vitro* acelera el proceso de crecimiento de las células meristemáticas de planta del arándano.
- La aplicación de diferentes concentraciones de fitorreguladores presenta mayor regeneración en los explantes.

1.5. OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo General

Establecimiento *in vitro* de dos variedades de arándano (*Vaccinium corymbosum L.*) O Neal y Misty en el laboratorio de Fitopatología y Cultivo In Vitro de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales

1.5.2. Objetivos Específicos

En base a los antecedentes indicados se plantea los siguientes objetivos:

- Evaluar la regeneración de explantes en dos Variedades de Arándano O' Neal y Misty.
- Evaluar la respuesta en diferentes concentraciones de Bencil Amino Purina en los medios de cultivo.
- Evaluar la contaminación de los explantes de los medios de cultivo.

CAPÍTULO II

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. MARCO TEÓRICO

2.1. TAXONOMÍA DEL ARÁNDANO

Reino	Vegetal
Phylum	Telemophytae
División	Tracheophyta
Subdivisión	Anthopyta
Clase	Angiospermae
Subclase	Dicotyledoneae
Grado Evolutivo	Metachlamydeae
Grupo de ordenes	Pentacíclicos
Orden	Ericales
Familia	Ericaceae
Nombre científico	<i>Vaccinium corymbosum L.</i>
Variedad	O Neal Misty

(Herbario Universitario. Ismael Acosta 2017)

2.2 ORIGEN Y CARACTERÍSTICAS

Los arándanos azules son originarios de la parte Este de Norte América, su cultivo como un producto hortícola empezó en Estados Unidos, país que se mantiene como el principal productor y consumidor. Antes que los colonizadores llegaran al Nuevo Mundo, los nativos de Norteamérica utilizaban estos frutos silvestres en su dieta y actualmente, la cosecha de éstos se mantiene como una importante industria en el Noreste de Estados Unidos y Este de Canadá.

Los arándanos del tipo „ojo de conejo“ (*Vaccinium ashei* Reade) fueron los primeros en cultivarse a finales de siglo XIX en el Sur de Estados Unidos. La producción del

arándano tipo „arbusto alto del norte“ (*V. corymbosum* L.) es un fenómeno del siglo XX originado con la investigación pionera de F. V. Coville y Elizabeth White en los comienzos de los 1900's (Chapingo.mx).

2.3. IMPORTANCIA ECONÓMICA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

América del norte (EEUU y Canadá) es la mayor productora mundial de arándanos cultivados, con 223 millones de kg sobre una superficie de casi 44.000 ha. A continuación está Chile, donde a pesar de ser un cultivo de reciente introducción, a principios de los 80, se ha situado en poco tiempo como segundo productor mundial, con algo más de 13.000 ha y una producción en torno a los 50 millones de kg, que representa el 90% de la producción de América del sur, donde, en menor significación, también se cultiva, en Argentina 3846 ha, Uruguay 749 y Perú.

Otras zonas productoras en el hemisferio sur son África del Sur, Australia 619 ha y Nueva Zelanda 587 ha. En Europa los principales países productores son, por este orden, Polonia 3158 ha, Alemania 2146 ha, España 1053 ha, Francia 360, Italia, Reino Unido, Países Bajos y Portugal. Y también se cultiva en Ucrania, Rumania, Austria, Suiza, Suecia, Dinamarca e Irlanda. Además están apareciendo nuevas zonas productoras como Marruecos en África, o Japón y China en Asia.

A pesar de ser una de las especies de más reciente introducción en la fruticultura mundial, la producción y consumo de arándanos en la última década ha tenido un crecimiento espectacular, tanto en América del Norte, donde ya había una gran tradición debido a la gran disponibilidad de estos frutos procedentes de poblaciones silvestres, como en otros países del continente europeo, Asia e incluso en algunos países del hemisferio sur, con poca o nula tradición de consumo.

Un dato muy elocuente en cuanto a este crecimiento es que en Estados Unidos, el mayor productor y consumidor a nivel mundial, a principios de los 90 el consumo per cápita estaba en torno a los 250 g/habitante y año, y hoy día está próximo a los 600 g (Juan García, Orientaciones para el cultivo de Arándano).

2.4. IMPORTANCIA DEL ARÁNDANO EN BOLIVIA

El arándano se ha convertido en un cultivo que requiere de mucho cuidado y control en su producción ya que la rentabilidad muestra estándares más elevados en comparación a otros productos en el mercado, el principal objetivo de los mayores productores del territorio nacional es realizar la exportación del producto especialmente al continente Europeo y al continente Asiático, siendo en estos lugares más valorados económicamente siendo ellos los mayores consumidores de la baya, es por eso que para cumplir con los estándares mínimos de los países importadores de esta fruta el manejo de la producción debe ser bien realizado y cumpliendo las normas internacionales de calidad.

En nuestro país en los últimos años comenzó a llegar la fruta a los mercados del territorio nacional, estando por ahora en una situación poco conocida para su consumo pero con mucho potencial de mercado (SEDAG, 2016).

2.5. DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA

2.5.1. Planta

Como se ha indicado, el nombre científico es *Vaccinium corymbosum* L, perteneciente a la familia Ericaceae. Se trata de arbustos erectos o rastreros, con altura variable según la especie (0,3 a 7,0 m), de hojas alternas, caducas o perennes, y de una gran longevidad, pudiendo superar los 50 años en muchos casos (Juan García, Orientaciones para el cultivo de Arándano).

2.5.2. Sistema Radicular

El sistema radical es superficial, situándose el 80% de éste en los primeros 40 cm, tiene raíces finas y fibrosas que se caracterizan por la ausencia de pelos absorbentes. Entre las raíces y la parte aérea se encuentra la corona, que tiene la capacidad de emitir brotes. En la mayoría de los casos se asocia de forma natural con una micorriza formando una simbiosis, traduciéndose ésta en un mayor desarrollo vegetativo. Es

sensible al encharcamiento en suelos pesados (Juan García, Orientaciones para el cultivo de Arándano).

2.5.3. Tallo

Presenta un pequeño tallo subterráneo (corona), recto, cuadrangular y muy ramificado. Generalmente son de color marrón-anaranjado, según la especie (Infoagro.com, 2016).

2.5.4. Hojas

Presenta hojas simples, alternas, con forma elíptico-lanceoladas, márgenes dentados y peciolo corto. Son de color verde cuya intensidad varía dependiendo de la especie. En otoño, adquieren un tono rojizo típico en la especie (Infoagro.com, 2016).

2.5.5. Flores

Axilares o terminales, en racimos de 6 a 10 en cada yema, sépalos persistentes, corola acampanada blanca con tonos rosas en algunos cultivares, formada por 4-5 pétalos fusionados, 8 a 10 estambres con anteras aristadas o no, prolongadas en tubos terminales con una abertura en el ápice, un pistilo simple, ovario ínfero, de 4 a 10 lóculos. El número de yemas de flor que puede desarrollarse en una rama de un arbusto del grupo “highbush” parece estar relacionado con el grosor de la rama, con el cultivar, así como por la influencia de varios reguladores de crecimiento (Juan García, Orientaciones para el cultivo de Arándano).

2.5.6. Fruto

El tipo de fruto es baya esférica de 1 a 3 cm de diámetro, con un peso de 0,5 a 4,0 g y varias semillas en su interior, 20 a 100, cuyo número está relacionado de forma positiva con el tamaño del fruto. Los frutos, a medida que maduran, pasan por distintos grados de color, adquiriendo el tono azul característico al finalizar la

maduración. A su vez, la epidermis del fruto está cubierta por secreciones cerosas, que le dan una terminación muy atractiva.

Los frutos más cercanos a las ramas son más grandes que los distales, y su tamaño se ha relacionado también con el vigor de la rama, es decir, ramas más vigorosas generalmente producen frutos mayores. Además, los primeros frutos maduros de un cultivar a menudo son mayores que los que se recogen más tarde.

Dos características comercialmente relevantes del fruto son: la cicatriz que queda al desprenderse el pedúnculo, que debe ser pequeña y seca a fin de dificultar la acción de los patógenos, y la firmeza, que está muy relacionada con el grosor de la epidermis (Juan García, Orientaciones para el cultivo de Arándano).

2.6. REQUERIMIENTO EDAFOCLIMÁTICO

2.6.1. Temperatura

El arándano es un cultivo que requiere un determinado número de horas-frío (temperatura inferior a 7°C) para salir de la latencia, que depende de la especie.

Para el desarrollo del cultivo del arándano, el rango óptimo de temperatura oscila entre 16-25°C. No obstante, puede llegar a tolerar temperaturas de hasta -30°C, aunque temperaturas de 28-30°C acompañadas de vientos secos, pueden provocar daños en el fruto como arrugamientos y quemaduras.

Durante la floración, temperaturas inferiores a -5°C pueden provocar daños en los frutos. Por esta razón, la ocurrencia de heladas durante la floración resulta muy perjudicial (Infoagro.com, 2016).

2.6.2. Riego

Se emplea un sistema de riego localizado. Es importante mantener el terreno húmedo, evitando en todo momento el encharcamiento. El agua de riego debe ser de buena calidad sin presentar salinidad ni exceso de calcio, boro o cloro (Infoagro.com, 2016).

2.6.3. Suelo

En cuanto a los suelos, estos deben ser de textura ligera, buen drenaje y abundante materia orgánica, superior al 3%, que permite mantener la retención de humedad necesaria para el óptimo desarrollo del sistema radical.

El pH del suelo es limitante para su cultivo, exigiendo valores ácidos, inferiores a 5,5, situándose el intervalo óptimo entre 4,5 y 5,5 (Juan García, Orientaciones para el cultivo de Arándano).

2.6.4. Humedad

El cultivo del arándano requiere de una humedad relativa alta más del 60%, si se produce en vivero se puede aplicar con riego por aspersion (Infoagro.com, 2016).

2.7. PROPAGACIÓN

2.7.1. Propagación por semilla

Esta propagación no es utilizada para la producción de fruto del Arándano para su comercialización, ya que esta forma de propagación solo es utilizada para el mejoramiento de las variedades,

Propagación asexual.- Esta es la técnica que se produce para producir plantines de arándano es a través de esquejes (Infoagro.com, 2016).

2.7.2. Propagación Asexual

Esta es la técnica que se produce para producir plantines de arándano es a través de esquejes.

En este método se utiliza un esqueje bien en verde, o con madera del año. Se deben obtener esquejes de unos 8cm de longitud con 4-5 yemas vegetativas y ausentes de yemas florales. El corte debe ser en bisel y por debajo de una yema. Las hojas basales también se deben eliminar con el fin de disminuir la tasa de transpiración.

Una vez obtenidos los esquejes de una plantación de plantas madres, se deben colocar en invernaderos, concretamente en camas calientes compuestas de turba y perlita. Con el fin de facilitar el enraizamiento, se pueden aplicar hormonas enraizantes como pueden ser el AIA (ácido indol acético), ANA (ácido naftilacético) o AIB (ácido indol butírico). La temperatura óptima de enraizamiento debe oscilar entre 18 y 23°C.

Finalizado el enraizamiento, dichos esquejes se deben trasplantar en bolsas de 20-25cm de diámetro, para su posterior traslado a vivero. Las plantas que pasan a vivero se deben mantener en las condiciones favorables para el cultivo.

La propagación de Arandano mas utilizada es mediante la técnica de cultivo *in vitro* (Infoagro.com, 2016).

2.8. CULTIVO IN VITRO

La micropropagación consiste en la propagación de un genotipo a gran escala a través del empleo de técnicas de cultivo “in vitro”.

El cultivo *in vitro* es una herramienta para el mejoramiento ya que se producen plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada.

Esto es posible gracias a la propiedad de totipotencia que tienen las células vegetales, esto es la capacidad de regenerar una planta completa cuando están sujetas a estímulos adecuados.

Así las células somáticas de cualquier tejido podrían formar tallos, raíces o embriones somáticos de acuerdo con la competencia que posean y al estímulo que reciban.

- Ovando (2004) Define al cultivo de tejidos vegetales como una herramienta de la Biotecnología Vegetal que aísla partes de una planta y las hace crecer en medios de cultivo artificial *in vitro* en condiciones de asepsia para obtener metabolitos, tejidos, órganos o plantas completas.
- In vitro, plantas o partes de una planta cultivada dentro de un contenedor de vidrio
- (del latín in. Adentro, vitro: vidrio)

Totipotencia: Capacidad de regeneración de una planta entera a partir de una célula o un grupo de células.

Explant: Porción de tejido de planta con el que, a través de técnicas *in vitro*, se puede regenerar la planta entera.

Desdiferenciación: consiste en la transformación y pérdida de las características de especialización de un tipo celular para dar lugar a las células de tipo meristemático.

El siguiente paso involucrado en la regeneración de una planta es la rediferenciación de las células previamente desdiferenciadas.

Todo proceso de diferenciación está regulado por el balance entre diferentes tipos de reguladores de crecimiento, fundamentalmente de auxinas y citocininas (Litz RE & Jarret RL, 1991).

2.8.1 Técnicas de cultivo de tejidos

- Micropropagación vegetal.
- Regeneración de plantas (embriogénesis y organogénesis).
- Cultivo de meristemas.
- Cultivo de suspensiones de células vegetales.
- Cultivo de protoplastos.
- Cultivo de anteras.
- Cultivo de óvulos y embriones.

2.8.2 Características generales de los cultivos *in vitro*

- Ocupa pequeña superficie.
- Control condiciones de cultivo. Ambientales (temperatura, humedad, luz), nutricionales (minerales, otros compuestos).
- Cultivo “aislado” biótica (ausencia de otros organismos) y abióticamente (viento, etc.).
- Alteraciones de las fases de desarrollo (indiferenciación y diferenciación, plantas carentes de sistema radical, etc.).
- Posibilita manipulaciones.
- Necesidad de restablecer el equilibrio del explanto (requerimientos exigentes). (Murashige, T. y F. Skoog. 1962)

NOTA. Las porciones del vegetal que se cultivan *in vitro*: “explantes” NO son autotróficos.

2.8.3. Medios de Cultivo

Los medios de cultivo constituyen un elemento fundamental para el cultivo in vitro de células, de tejidos, protoplastos, anteras y para lograr el desarrollo de embriones, la organogénesis, la micro propagación, etc. Los medios de cultivo tienen una serie de componentes generales específicos cuya presencia y concentración estará en dependencia del objetivo que se persiga en su utilización.

El cultivo de células, tejidos y órganos de la plantas in vitro se realiza en medios de cultivos artificiales, lo cuales proporcionan los nutrientes necesario que la planta toma de la tierra en su habitat natural y precisamente el éxito de este tipo de cultivo está influenciado grandemente por la naturaleza del medio de cultivo utilizado y otros factores ambientales (Murashige, T. y F. Skoog, 1962).

Nota: el tipo de medio de cultivo se prepara en base al cultivo que se desea trabajar; en el trabajo realizado se utilizó el medio de WPM (Woody Plant Medium); medio de cultivo para plantas leñosas.

Cuadro № 1

Composición del medio de Cultivo Woody Plant Medium (1981)

Macro Elementos	Compuesto	(mg/L)
NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	400.000
CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio bihidratado	96.000
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.000
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio	170.000
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	Nitrato de calcio tetrahidratado	556.000
K ₂ SO ₄	Sulfato de potasio	990.000
Micro Elementos	Compuesto	(mg/L)
H ₃ BO ₃	Ácido bórico	6.200
MnSO ₄ .H ₂ O	Sulfato de manganeso hidratado	22.300
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sodio bihidratado	0.025
Quelatos	Compuesto	(mg/L)
FeSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato ferroso heptahidratado	27.800
Na ₂ EDTA	Sal de sodio del ácido etilendiamino tetra acético	37.300
Vitaminas	Compuesto	(mg/L)
	Tiamina	100.00
	Inositol	1.000
	Ácido nicotínico	0.500
	Piridoxina	0.500

Los medios de cultivo pueden ser sólidos o líquidos, los cuales están constituidos básicamente de:

2.8.3.1. Compuestos Inorgánicos

Los nutrientes inorgánicos o minerales usados en el cultivo in vitro son los mismos requeridos normalmente por las plantas. Entre estos tenemos los macro nutrientes (N, P, K, S, Ca, Mg) y los micro nutrientes (Fe, B, Mo, Co, Zn, Cu, I).

2.8.3.1.1. Macronutrientes

Los macronutrientes son constituyentes esenciales para el crecimiento de los tejidos vegetales debido a que intervienen en la conservación del equilibrio iónico en las plantas.

Estos macronutrientes proveen los seis elementos indispensables: Nitrógeno (N), Fosforo (P), Potasio (K), Calcio (Ca), Magnesio (Mg) y Azufre (S). La concentración óptima de cada nutriente para alcanzar la máxima tasa de crecimiento varía considerablemente entre especies y la finalidad del cultivo (Aguirre G et al.2010).

2.8.3.1.2. Micronutrientes

Los micronutrientes representan un papel esencial en los mecanismos enzimáticos como activadores o constituyentes de las coenzimas. Los principales micronutrientes son: Hierro (Fe), Manganeso (Mn), Zinc (Zn), Boro (B), Cobre (Cu) y Molibdeno (Mo). Algunos medios contienen Cobalto (Co), Iodo (I), y Cloro (Cl), aunque no son esenciales para el crecimiento (George & Sherington, 1984).

2.8.3.2. Compuestos orgánicos

Constituidos por tres tipos de compuestos:

- Las vitaminas y aminoácidos
- Los carbohidratos
- Sustancias de crecimiento (fitohormonas)
- Agua

El agua es el elemento donde se disuelve todos los componentes del medio de cultivo. Se debe prestar gran atención a la calidad de agua, ya que constituye el 95% del medio nutritivo, se debe utilizar agua destilada.

2.8.3.2. Compuestos Orgánicos

Los compuestos orgánicos de los medios de cultivo son: aminoácidos, vitaminas, azúcares, productos orgánicos estimulantes y reguladores de crecimiento.

2.8.3.2.1. Aminoácidos

El aporte de aminoácidos favorece la proliferación de callos, aunque cuando más se acude a los mismos es en las experiencias sobre la organogénesis y en la multiplicación vegetativa *in vitro*. Las mezclas de aminoácidos parecen también presentar efectos sinérgicos estimulando fuertemente la proliferación de callos y la organogénesis. Los efectos obtenidos mediante el aporte de aminoácidos parecen muy variables según la especie y el tipo de morfogénesis estudiada. Hasta el momento no es posible obtener una regla general.

La mayor parte de las plantas sintetizan sus propios elementos orgánicos como las vitaminas y aminoácidos, etc. Para alcanzar un mejor crecimiento de las plantas *in vitro* es esencial suplementar al medio más vitaminas y aminoácidos como : Tiamina (vitamina B1), Piridoxina (vitamina B6), Acido Nicotínico(Vitamina B3), y Pantotenato de calcio (vitamina B5), además de Myo- Inositol ; son también conocidos como reguladores de desarrollo, algunos autores señalan la adición de numerosas sustancias orgánicas como : la caseína hidrolizada, leche de coco, extracto de malta, extracto de levadura entre otros, son empleados para el desarrollo de ciertos cultivos de callos y órganos.

2.8.3.2.2. Vitaminas

Las vitaminas son usadas como catalizadores en varios procesos metabólicos y son añadidas al medio de cultivo para estimular procesos de crecimiento específicos en los tejidos, y no se excluye que la falta de alguna de ellas pueda ser un factor limitante de los fenómenos de organogénesis.

Para Murashige las vitaminas esenciales para el crecimiento de células en plantas superiores son :

Tiamina: Es considerada la vitamina imprescindible en el cultivo *in vitro* para un buen crecimiento del cultivo.

Myo – Inositol: Estimula el crecimiento y división celular en muchas especies vegetales con fines de micropropagación. La concentración más utilizada es de 100 mg / l. (Aguirre et al 2010).

1.8.3.2.3. Azúcares

Los tejidos y células cultivadas *in vitro* son ampliamente heterótrofos con respecto al carbono debido a la ausencia o insuficiencia de asimilación clorofílica. Luego resulta indispensable añadir azúcares a los medios de cultivo, siendo los dos más utilizados la sacarosa y la glucosa.

La concentración óptima de azúcar en los medios de cultivo varía entre 20-80g / l, en dependencia del tipo de cultivo, material vegetal, etc. Los azúcares presentan una acción metabólica y energética.

2.8.3.2.4. Carbohidratos

El carbohidrato más utilizado es la sacarosa, siendo la fuente de energía más usada en el cultivo *in vitro*, pero en ocasiones se emplean otros carbohidratos como la glucosa, fructuosa, galactosa y maltosa, pero estos compuestos son inferiores a la sacarosa, que puede ser sustituida por azúcar comercial, llegándose a obtener óptimos resultados. Las concentraciones óptimas son de 2 a 3 %, sin embargo en ciertas especies se utilizan concentraciones muy elevadas de 5 a 12%.(Aguirre.et al 2010).

2.8.3.2.5 Reguladores de crecimiento

2.8.3.2.5.1. Auxinas

Se añaden frecuentemente a los medios de cultivo en concentraciones de 0.01 – 10 mg/l. Las auxinas generalmente promueven el crecimiento vegetal por alargamiento celular, induciendo a la formación del callo y estimula la iniciación radicular y el crecimiento de las raíces.

Las auxinas son compuestos que tienen un núcleo indólico, éste se sintetiza a partir del aminoácido Triptófano que se sintetiza por la vía Shikimica, la principal auxina es el ácido 3-indolacético (AIA), pero también se pueden emplear el ácido 3 – indol propiónico (AIP), y el ácido 3 – indol butírico (AIB), aunque son auxinas relativamente débiles (ácido fenilacético) o fuertes: ácido naftalenacético (ANA), el ácido 3 naftoxiacético (NOA), etc. El 2,4 D(acido 2,4 diclorofenoxiacético) es una auxina muy fuerte.

El ácido picolinico (picloran), aunque con una estructura química diferente, produce en ocasiones efectos olimerasa comparables a los del 2,4-D ; se emplea a concentraciones muy bajas .

El AIA es la auxina natural ms difundida en las plantas, es ampliamente utilizada en los medios de cultivo pero es sensible a la degradación enzimática (AIA - oxidasa) y a la fotooxidación, a veces en asociación con el AIB.

El 2,4 –D es una auxina muy fuerte, toxica a concentraciones elevadas, que es un fuerte activador de la actividad meristemática; su empleo es amplio, muchas veces ligado a citoquininas, en trabajos de cultivos celulares, cultivos de tejidos, embriogénesis somática.

Efectos:

- Crecimiento: estimulan la elongación celular en tallos y coleoptilos (tallos jóvenes), incrementan la extensibilidad de la pared celular y estimulan la diferenciación del xilema y el floema.
- Dominancia apical: la yema apical del tallo inhibe el crecimiento de yemas axilares cercanas.
- Abscisión de órganos (hojas flores y frutos): posee un control genético y las auxinas retrasan, la caída aunque el etileno lo induce.
- Rizogénesis: estimulan la formación de raíces laterales o adventicias. Inhiben la elongación de la raíz principal.(George 1993) señala que las concentraciones óptimas de auxinas varían de 0,1 a 10 mg/l.

2.8.3.2.5.2. Citoquininas

Son un grupo más reducido de hormonas que deben su nombre a su función (citoquinesis). En conjunto con las auxinas estimulan la división celular.

Derivan de adeninas y las más frecuentes son:

- Naturales
La zeatina N⁶-8N⁶-4 Hidroxi, 3 metil, 2 butiril), posee un doble enlace en el centro de la cadena y tiene isómeros cis y trans que parecen ser formas naturales
- Sintéticas
La quinetina (KIN), N⁶ Bencilaminopurina (BAP), N⁶benciladenina (BA) N⁶ dimetil alil aminopurina (2ip). (Mejía, 1994).

Efectos:

- Crecimiento. En conjunto con las auxinas, las citoquininas estimulan la proliferación de células meristemáticas, y también estimulan la expansión de los cotiledones tras el primer haz de luz que reciben. (George, 1993).
- Dominancia lateral: estimulan el crecimiento de yemas laterales inhibiendo la apical (contrario a las auxinas, por lo deben estar en equilibrio)
- Diferenciación y morfogénesis: Provocan cambios en la morfología según el tipo de crecimiento, junto a las auxinas estimulan la formación de raíces y tallos.
- Senescencia: Son anti-senescentes (García et al , 2006).

2.8.3.2.5.3. Giberelinas

Cuadro № 2

Necesidades Nutricionales y Hormonales.

Necesidades nutricionales y hormonales de los cultivos de órganos y tejidos vegetales		
Agua		
Sustancias orgánicas	Macro	Micro
	Nutrientes	
Azúcares Aminoácidos Vitaminas Auxinas Citoquininas Giberelinas	N P K Ca Mg S	Fe Zn B Mn Cu Ni Co Al Mo I

Son hormonas que proceden de una estructura química, no de una función concreta. Su estructura química deriva del ent-giberelano. Es un grupo de hormonas muy heterogéneo, son de muchas formas aunque pocas con función.

Efectos

- Estimulan el crecimiento de tallos (elongación) e hipocotilos. Tienen un papel mayor que las auxinas en plantas con crecimiento de entrenudos. En la reproducción estimulan la floración, sobre todo en aquellas plantas con floración por factores ambientales o floración del día largo como las coníferas. Producen partenocarpia (reproducción sin fecundación donde el fruto se genera sin semillas). Tienden a producir plantas masculinas en especies dioicas.
- La germinación es su principal efecto. Casi todas las semillas germinan inducidas por GA. Posibilitan la movilización de reservas en la semilla, sustituyen requisitos ambientales. (Roca, 1997) menciona que el uso de AG3 ha demostrado ser bastante activo, en concentraciones óptimas de 0,01 a 1 mg/l, debido a que niveles superiores a 1 mg/l son tóxicos para el desarrollo del explante.

Cuadro Nº 3
Concentración de Hormonas para Medios de Cultivo

Medio nutritivo: Fitohormonas	
Auxinas 0.01 a 10 mg/l Acido indol Acético (AIA) Acido Indol Butirico (IBA) Acido Naftalén Acético (ANA) 2-4 D Se disuelven en NaOH 1N	Citocininas 0.03 a 10 mg/l Bencil adenina-(BA) Bencilaminopurina (BAP) 2ip Zeatina Tridiazuron Se disuelven en HCl 1N
Giberelinas	En cultivo de meristemas y para elongación: Acido Giberélico (GA ₃)

2.8.3.3. Material de soporte

2.8.3.3.1. Medios Sólidos

Los medios líquidos son los medios de cultivo que llevarán distintos componentes que tienden a solidificar y mantener el material cultivado en superficie. La selección de un agente gelificante para las plantas específicas es generalmente empírica y por razones desconocidas, los tejidos de algunas especies crecen mejor en algunos gelificantes que en otros (Orellana, 1998).

El agar es el material de soporte más utilizado en el cultivo de tejidos por proveer al medio de un excelente gel húmedo, sin embargo no es inerte (Hurtado & Merino, 1994).

Peres & Claire (2004), mencionan que el agente gelificante más económico hasta ahora probado en laboratorios locales es la carragenina, el mismo se obtiene de algas rojas como principal fuente.

2.8.3.3.2. Medios Líquidos

Los medios líquidos son una alternativa interesante para cultivar explantes *in vitro*. Con ayuda de un agitador el medio de cultivo está constantemente homogeneizado y, lo que es más importante oxigenado. Estas condiciones pueden superar algunas limitantes del medio sólido; sin embargo, puede a su vez suceder una mayor susceptibilidad de los explantes a vitrificarse.

Al momento de utilizar de medios sólidos colocar el explante sobre un puente de papel filtro que permanece en contacto directo con el medio líquido, generalmente este tipo de medios es utilizado en especies con problemas de oxidación (Mejía & Vittorelli, 1997).

2.8.4. Ventajas, y Desventajas de la Técnica de Cultivo In Vitro.

2.8.4.1. Ventajas

- Permite obtener plantas libres de enfermedades (hongos, bacterias, micro plasmas, virus y tiroides).
- La micropropagación vegetal nos permite propagar masivamente material vegetal en cualquier época del año y en corto tiempo conservando su potencial genético y calidad sanitaria.
- Permite optimizar el uso de factores ambientales y nutricionales.
- Facilita el cultivo de un gran número de plantas en una superficie pequeña
- Puede conservar material biológico por periodo de tiempo prolongados.
- Además mediante este método de propagación se puede incluir aspectos de fitomejoramiento.

2.8.4.2 Desventajas

El cultivo in vitro es muy caro, entre otras cosas porque no se puede mecanizar. Sólo son rentables aquellos laboratorios muy grandes y con mucho mercado.

2.8.5. Fases del Proceso de Micropropagación de Cultivo *In Vitro*.

Dentro del proceso de micropropagación se pueden diferenciar varias fases o etapas:

- 1: Preparación de la planta madre.
- 2: Introducción del material seleccionado in vitro
- 3: Multiplicación de brotes
- 4: Enraizamiento
- 5: Aclimatación

Esta secuencia de etapas abarca el ciclo completo de la multiplicación de plantas *in vitro* y puede ser aplicada a diferentes especies vegetales.

2.8.5.1 Preparación de la Planta Madre

Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantos con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Para obtener estos explantos es recomendable mantener a las plantas madre, es decir la planta donante de yemas, durante un período que puede oscilar entre unas semanas o varios meses en un invernadero bajo condiciones controladas. En ese ambiente se cultiva la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades (Castillo.A, 2004).

2.8.5.2. Introducción del Material *In Vitro*

Luego de la desinfección superficial, las semillas o las yemas dependiendo del material seleccionado, se ponen en medio de cultivo estéril. En un período de una semana o quince días, comienza el proceso de germinación o regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo de cultivo *in vitro* (Castillo.A, 2004).

2.8.5.3. Multiplicación de los Brotes

Durante esta fase se espera que los explantes que sobrevivieron las fases anteriores originen brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varias hojas. En la base de cada hoja hay una yema que se desarrollará luego de ser puesta en contacto con el medio de cultivo. Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados. Estas operaciones se realizan en la cámara de flujo laminar o en un lugar aislado que nos permita mantener las condiciones de asepsia. De esta forma aumenta el número de plantas en cada repique o división de las plantas. El número de plantas que se obtiene dependerá de la especie vegetal y de las condiciones del medio de cultivo. El número de plantas que se obtiene por la vía de la micropropagación

permite alcanzar incrementos exponenciales, considerando que todos los factores que afectan el crecimiento hayan sido optimizados (Castillo.A, 2004).

2.8.5.4. Elección de un Medio de Enraizamiento de los Explantos

Para enraizar los explantos se utilizan principalmente plantines individuales de un tamaño aproximado de 2 cm. Los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación se transfieren a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga hormonas del tipo de las auxinas. Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea (Castillo.A, 2004).

2.8.5.5. Aclimatación de los Explantos Enraizados.

Los explantes recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso dependen de la aclimatación. En esta etapa las plantas sufrirán cambios de diferente tipo que permitirán la adaptación de las mismas a vivir en condiciones naturales. En el momento en que se extraen los explantes o plantines enraizados de los frascos, están poco adaptados a crecer en un invernáculo, ya que estos explantes han enraizado y crecido en ambientes con una humedad relativa muy elevada y generalmente tienen estomas (estructuras responsables de regular la transpiración y pérdida de agua en la planta) que no son completamente funcionales frente a descensos de la humedad relativa, y por lo tanto demasiado lentos para evitar la desecación del explante.

Por otra parte, crecer en ambientes tan húmedos también suele implicar la falta de una cutícula con cera bien desarrollada, que representa la barrera física para evitar la pérdida de agua a lo largo de toda la superficie de la planta. Los plantines enraizados, deben ser aclimatados a las condiciones de humedad del invernadero disminuyendo progresivamente la humedad relativa e incrementando progresivamente la intensidad de luz. Estos plantines se plantarán en contenedores (almacigueras) cubiertos por un

plástico, para mantener la humedad relativa elevada. La elección de un sustrato con buenas características físicas, es clave para el éxito de esta etapa. Para el trasplante, elegimos un sustrato suelto, poroso, con mezcla de arena turba, cáscara de arroz quemado, para permitir un desarrollo y crecimiento de raíces muy rápido.

Las mezclas son diferentes y muy variadas de acuerdo a la especie con la que estamos trabajando. Luego de retirar cuidadosamente el agar de las raíces para evitar dañarlas, los plantines se enjuagan y se colocan en almacigueras con la mezcla de sustratos seleccionada y cubiertos con nylon. Todos los días se debe controlar el nivel de humedad en las almacigueras. Si es necesario, se aplica un riego con una pulverizadora manual, para mantener un ambiente húmedo a nivel del sustrato. A los 15 días del trasplante, se puede comenzar a levantar la cobertura de nylon en las horas de menor calor (temprano en la mañana o en la última hora de la tarde). Al comienzo las plantas se dejan media hora por día destapadas. A la semana siguiente se dejan destapadas durante una hora. Al mes del trasplante, se dejan tapadas durante la noche y si hay crecimiento de nuevas hojas, las plantas pueden permanecer destapadas. Las condiciones del cultivo in vitro, generan cambios en algunos aspectos anatómicos y fisiológicos de las plantas, por esta causa, durante la aclimatación, los cambios deben ser muy graduales, para minimizar el estrés y tener mayor tasa de sobrevivencia (Castillo.A, 2004).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LOCALIZACIÓN

El presente trabajo de estudio se realizó en el laboratorio de Fitopatología y Cultivos *in vitro* dependiente de la Universidad Autónoma Juan Misael Saracho, ubicado en la zona de El Tejar que encuentra en la Ciudad de Tarija, Provincia Cercado a 21°33 de latitud Sur y 64°48 de longitud Oeste, a una altura de 1859 m.s.n.m.

3.2 MATERIALES

3.2.1 Material Vegetal

3.2.1.1 Procedencia del Material Vegetal

El material vegetal o plantas madres, que se utilizó para el presente trabajo de investigación serán variedades de Arándano (*Vaccinium corymbosum L.*) Que se usaran en las diferentes etapas del cultivo *in vitro*.

- Variedad O Neal

- Variedad Misty

La procedencia del material vegetal empleado es de variedades que se están produciendo en nuestro medio, obtenidas de la Compañía Industrial de Tabaco sucursal No. 21 ubicada en el barrio San Gerónimo No. 3255 de la ciudad de Tarija, provincia Cercado, departamento de Tarija.

3.2.2. Material de Laboratorio

Equipos

- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- pH-metro
- Balanzas de precisión
- Microscopio
- Agitador
- Horno de Esterilización
- Horno Microondas
- Refrigerador
- Temporizador
- Luces led
- Estantes

Materiales

- Cajas Petri
- Vasos de Vidrio
- Pipeta
- Probeta

- Tubos de Ensayo
- Canastillas
- Bureta de 100 ml
- Bisturí
- Mechero
- Papel Filtro
- Papel de Aluminio
- Frascos de Vidrio
- Encendedor
- Marcador
- Sales con un alto porcentaje de pureza
- Fitorregulador (BAP- Bencil Amino Purina),
- Agar
- Sacarosa
- Mio inositol
- Vitaminas
- Alcohol
- Hipoclorito de Sodio
- Agua Destilada

3.3. METODOLOGÍA

La metodología de investigación que se utilizó es la investigación " Experimental y Descriptiva", pues se evaluó el porcentaje de contaminación, el porcentaje de regeneración.

Se busca establecer la mejor concentración de Bencil Amino Purina en el mejor medio de cultivo para futuras investigaciones.

La concentración de BAP se realizó por separado con concentraciones de Bencil Amino Purina (6 mg/L) - Bencil Amino purina (9 mg/L) – Bencil Amino purina (15mg/L), - Bencil Amino purina (3 mg/L) – Bencil Amino purina (12 mg/L) y se los trato con las dos variedades O Neal y Misty para su posterior evaluación.

3.3.1 Variables a estudiar

3.3.1.1 Porcentaje de Regeneración

En las células meristemáticas existe la mayor concentración celular de toda planta por lo tanto esto dará como función un nuevo brote en esa sección de la planta, el primer ensayo se medirá a los 21 días de forma visual después de haber realizado la introducción del arándano en el cultivo *in vitro* para, después realizar el segundo ensayo con la mejor respuesta de Bencil Amino Purina en el anterior ensayo, midiendo de forma visual a los 21 días después de haber introducido el mismo; se realizara con la mejor respuesta de Bencil Amino Purina de los dos ensayos anteriores para así realizar el tercer y último ensayo.

3.3.1.2 Porcentaje de Contaminación

La técnica de cultivo *in vitro* es muy propensa a la contaminación, por lo que se requiere un alto grado de asepsia para dicha técnica, es por esto que las muestras se someten a sustancias que pueden eliminar los hongos y bacterias adheridos de forma superficial.

Las muestras se evaluaron consecutivamente hasta los 90 días después del primer ensayo de forma visual y con ayuda del microscopio para así comprobar si se contaminaron dichas muestras.

3.4. PROCEDIMIENTO

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Fitopatología y Cultivo *In Vitro* de la Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales el procedimiento que se realizó fue el siguiente:

Se llevaron las plantas madres de dos variedades O Neal y Misty al laboratorio donde estas servirán para separar los explantes para continuar con el procedimiento de establecimiento *in vitro*.

Para la técnica de establecimiento *in vitro* se siguieron los siguientes pasos:

1. Se seleccionó las plantas madre en el mes de Agosto, del vivero de la compañía de tabacos en la ciudad de Tarija.
2. Medir la concentración de sales para la preparación de medio de cultivo WPM.
3. Preparación del medio de cultivo WPM.
4. De la planta madre se seleccionaron los explantes de los segmentos nodales buscando los de mejor vigorosidad.
5. Se llevó a la esterilización del material en los equipos de Autoclave y el horno.

6. Se preparó el medio de cultivo en vasos de precipitación de 1/2 litro.

El medio de cultivo está constituido de la siguiente manera:

- ✓ M1: Macro elementos
- ✓ M2: Micro elementos
- ✓ M3: Vitaminas
- ✓ M4: Fuentes de hierro
- ✓ Sacarosa

7. Se dividió en 3 vasos precipitados por partes iguales

8. Colocar en cada vaso de precipitación por separado, la concentración de hormonas

✓ Reguladores de crecimiento.

Cuadro № 4
Primer Ensayo

M1	Bencil Amino Purina (6 mg/ L)
M2	Bencil Amino Purina (9 mg/L)
M3	Bencil Amino Purina (15 mg/L)

Cuadro Nº 5
Segundo Ensayo

M1	Bencil Amino Purina (3mg/L)
M2	Bencil Amino Purina (6 mg/L)
M3	Bencil Amino Purina (12mg/L)

Cuadro Nº 6
Tercer Ensayo

M1 BAP (6 mg/L)	Variedad O Neal
M1 BAP (6 mg/L)	Variedad Misty

8. Medir el pH de los medios de Cultivo con WPM en diferentes concentraciones de BAP en un valor de 5.7 para todos los tratamientos del trabajo.
9. Adicionar el Agar 1.16 gr. a cada uno de los tres vasos de precipitación donde está con los medios de cultivo en diferentes concentraciones de BAP. Y llevar al horno microondas para que el Agar entre en calor y se pueda disolver en el líquido cuidando de no llegar al punto de ebullición del agua (100 °C).

10. Retirar los vasos precipitados del horno microondas con mucha precaución mezclando con una varilla de vidrio el Agar comenzara a solidificar el medio cuando la temperatura disminuya dejando a la preparación del medio de cultivo.
11. Colocar en los tubos de ensayo en medio de cultivo señalando la canastilla para evitar confundirse con los medios de cultivo.
12. Tapar los tubos de ensayo.
13. Colocar los tubos de ensayo en la canasta de la Autoclave, también esterilizar 6 frascos tapados y con agua destilada adentro de los mismos para utilizar más adelante, esta esterilización en la autoclave se la realiza durante 20 minutos mediante la aplicación de calor húmedo sobre una presión de 1.2 atmosferas y una temperatura de 121 °C.
14. Los materiales sólidos que serán utilizados en la fase de introducción como ser: pinzas, mangos de bisturí, cajas Petri, tubos de ensayo y vasos precipitados serán esterilizados en el horno forrados con papel periódico a una temperatura de 120 °C por lapso de 2 horas.
15. Los segmentos nodales serán extraídos de la planta cortando las hojas desde el peciolo.
16. Para desinfectar el material vegetal antes de ir a la cámara de flujo de laminar se debe utilizar detergente líquido enjuagando las muestras con agua destilada.
17. Una vez estando con todos los materiales desinfectados y esterilizados llevar a la habitación de siembra, limpiando antes la cámara de flujo laminar con alcohol.

18. Introducir a la cámara de flujo laminar los materiales que se va a trabajar teniendo muy en cuenta el protocolo de estos casos para evitar el máximo porcentaje de contaminación en nuestro trabajo de investigación.
19. Preparar el alcohol al 70% y también el Hipoclorito de Sodio al 4% con la bureta de 100 ml. para desinfectar los explantes.
20. Para desinfectar los explantes con alcohol e Hipoclorito de Sodio primero se deja los explantes dentro del frasco que contiene alcohol al 70% por 30 segundos.

Alcohol concentración 96%

$$\begin{array}{l} 100 \text{ ml} \longrightarrow 96 \\ x \longrightarrow 70 \\ x = 72.91 \text{ ml} \end{array}$$

Hipoclorito de sodio concentración 5.5%

$$\begin{array}{l} 100 \text{ ml} \longrightarrow 5.5 \\ x \longrightarrow 4 \\ x = 72.72 \text{ ml} \end{array}$$

21. Luego pasar los explantes al frasco que contiene Hipoclorito de sodio al 4% durante 10 minutos.
22. Enjuagar tres veces en los frascos con agua destilada por el lapso de 3 min en cada frasco.

23. Colocar los segmentos nodales dentro de los tubos de ensayo que contienen los medios de cultivo, flameando los materiales de trabajo dentro de la cámara de flujo laminar.
24. Sellar los tubos de ensayos con el papel de cocina cortado en tiras con un ancho de 2 cm. dando dos vueltas al tubo de ensayo.
25. Señalar con el marcador los tubos para su evaluación de la introducción.
26. Llevar los tubos introducción a la sala de crecimiento ahí los explantes recibirán 16 horas de luz artificial.

3.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

Diseño completamente al azar, es un diseño en el cual los tratamientos son asignados aleatoriamente a todas las unidades experimentales. Este diseño es usado ampliamente pero su uso se limita a casos en los que se dispone de unidades experimentales homogéneas. En investigaciones donde se emplea la técnica de cultivo de tejidos vegetales, generalmente se usa el diseño completamente al azar, puesto que el material experimental es homogéneo. (Hurtado. D, 1994)

Para la presente investigación, en la fase de establecimiento, se usó el diseño experimental completamente al azar de acuerdo al siguiente orden:

Diseño: Completamente al azar con arreglo bifactorial dos por tres

Factor A: Dos variedades de Arándano (*Vaccinium corymbosum L.*) O Neal y Misty

Factor B: 3 medios de cultivo (Medio base WPM Woody Medium Plant, con variación en Bencil Amino Purina (Hormona reguladora de Crecimiento))

Nº de repeticiones: 3

N° de tratamientos: 6

Unidad experimental: 3 tubos de ensayo (un segmento nodal por tubo de ensayo).

3.5.1. Ensayo 1 Tratamientos

Variedad 1 (O Neal)

Tratamiento 1 es con Bencil Amino Purina a 6mg/ L (M1)

Tratamiento 2 es con Bencil Amino Purina a 9mg/L (M2)

Tratamiento 3 es con Bencil Amino Purina a 15mg/L (M3)

Variedad 2 (Misty)

Tratamiento 1 es con Bencil Amino Purina a 6 mg/ L (M1)

Tratamiento 2 es con Bencil Amino Purina a 9 mg/L (M2)

Tratamiento 3 es con Bencil Amino Purina a 15 mg/L (M3)

3.5.2 Ensayo 2 Tratamientos

Variedad 1 (O Neal)

Tratamiento 1 es con Bencil Amino Purina a 3 mg/L

Tratamiento 2 es con Bencil Amino Purina a 6 mg/L

Tratamiento 3 es con Bencil Amino Purina a 12 mg/L

Variedad 2 (Misty)

Tratamiento 1 es con Bencil Amino Purina a 3 mg/L

Tratamiento 2 es con Bencil Amino Purina a 6 mg/L

Tratamiento 3 es con Bencil Amino Purina a 12 mg/L

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ENSAYOS

En este trabajo de investigación se realizaron varios ensayos en los cuales se evaluó: el porcentaje de contaminación, y el porcentaje de regeneración, en dos variedades de arándano.

4.1.1 Primer Ensayo

El Primer ensayo se realizó el día 5 de Septiembre del 2016 hasta el 26 de septiembre del 2016.

4.1.1.1 Resultados de Regeneración de Arándano en la Fase de Establecimiento Primer Ensayo

4.1.1.1.1 Análisis de Regeneración Primer Ensayo

Cuadro Nº 7

Análisis de Regeneración Primer Ensayo

TRATAM./REP	TRATAM./REP	I	II	III	Σ	X
V1	V1M1	1	1	2	4	1,33
	V1M2	2	1	1	4	1,33
	V1M3	1	0	0	1	0,33
V2	V2M1	1	0	1	2	0,67
	V2M2	0	0	0	0	0,00
	V2M3	0	0	0	0	0,00
Σ	Σ Blog.	5	2	4	11	3,67
X	X					0,61

- La variedad O Neal, fue quien mejor respondió en este ensayo en comparación a la variedad Misty.
- Tanto el medio de cultivo 1 y 2 para la variedad O Neal demostraron que se adaptaron mejor a los medios de cultivos diseñados para las plantas semileñosas (WPM), siendo en éstos la concentración de Bencil Amino Purina de 6 mg/L para la V1M1 y 9 mg/L para V1M2.
- Analizando más la variedad O Neal, pudimos observar que en la V1M3 la regeneración fue menor en comparación de los medios 1 y 2 de la misma variedad; en ésta la concentración de BAP (Bencil amino purina) fue de 15mg/L. siendo mayor el contenido de citoquininas a los anteriores.
- En la variedad Misty la regeneración fue mucho más baja en comparación de la variedad O Neal teniendo solamente un 0.67 de media de regeneración y en un medio de cultivo en la V2M1.
- En el V2M2 y V3M3 no se obtuvieron resultados de regeneración.

4.1.1.1.2 Análisis De la Varianza

Cuadro Nº 8

Análisis de la Varianza Regeneración

Primer Ensayo

Fv	gl	SC	CM	F _C	F _T 5%	F _T 1%	
TOTAL	17	8,3					
repeticiones	2	0,8	0,4	2,1	4,1	7,56	
TRATA	5	5,6	1,1	5,9	3,33	5,64	**
ERROR	10	1,9	0,2				
Fact.Var	1	2,7	2,7	14,4	4,96	10,04	**
Fact.MC	2	2,1	1,1	5,6	4,1	7,56	*
MC/Var	2	0,8	0,4	2,1	4,1	7,56	
CV %						2,27	

El cuadro Nro. 8 de ANOVA presenta diferencia significativa al 1% ya que la Fc es mayor a Ft 5%

En los tratamientos existen diferencias significativas por lo cual nos hace reflejar que uno de los tratamientos es mejor que el otro.

Tenemos un coeficiente de varianza de 2.27 este dato nos indica que los datos son homogéneos.

4.1.1.1.3 Análisis del Cuadro de Medias de Diferencia Significativas

Cuadro Nº 9

**Media de Diferencia Significativa cuadro de regeneración
Primer Ensayo**

MDS=1,57		V1M1	V1M2	V2M1	V1M3	V2M2	V2M3
		1,33	1,33	0,67	0,33	0,00	0,00
V1M1	1,33	0,00	0,00	-0,66	-1,00	-1,33	-1,33
V1M2	1,33	0,00	0,00	-0,66	-1,00	-1,33	
V2M1	0,67	0,66	0,66	0,00	-0,34		
V1M3	0,33	1,00	1,00	0,34			
V2M2	0,00	1,33	1,33				
V2M3	0,00	1,33					

Letras iguales según MDS no difieren a 5% de probabilidad.

4.1.1.1.4 Análisis de Diferencia de Medias de los tratamientos

Cuadro Nº 10

**Análisis de Diferencia de Medias Tratamientos Regeneración
Primer Ensayo**

Nº	TRAT.	DESCRIPCION	CM	RANGO
1	V1M1	Variedad O' Neal + medio 1 BAP 6 mg/l	1,33	a
2	V1M2	Variedad O' Neal + medio 2 BAP 9 mg/l	1,33	a
3	V2M1	Variedad Misty + medio 1 BAP 6 mg/l	0,67	b
4	V1M3	Variedad O' Neal + medio 3 BAP 15 mg/l	0,33	b
5	V2M2	Variedad Misty + medio 1 BAP 9 mg/l	0,00	b
6	V2M3	Variedad Misty + medio 1 BAP 15 mg/l	0,00	b

Los mejores resultados fueron los tratamientos es V1M1 y el V1M2 porque presentó mejor respuesta de regeneración en comparación a los demás tratamientos.

En los tratamientos V1M1 y V1M2 presentaron el mismo número de cuadrados de Medios siendo en cada uno de ellos 1,33.

Los tratamientos V2M2 y V2M3 no presentaron regeneración en ninguna de las muestras, ambos pertenecen a la Variedad Misty.

En el Primer Ensayo los resultados arrojados dieron a interpretar que la variedad O Neal respondió mejor en todos sus tratamientos que en todos los de la variedad Misty.

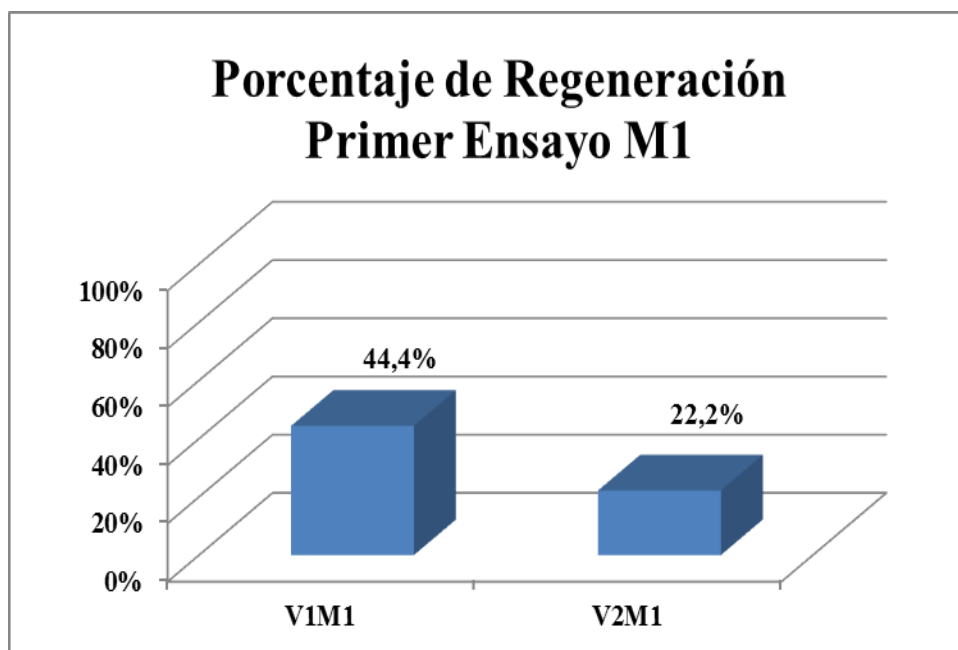
El tratamiento V2M1 fue el único quien presentó resultados para la variedad Misty en este primer ensayo obteniendo en el cuadrado de medios un número de 0,33.

4.1.1.1.5 Análisis del Porcentaje de Regeneración

4.1.1.1.5.1 Porcentaje de Regeneración del Primer Ensayo M1

Figura Nº 1

Porcentaje de Regeneración del Primer Ensayo M1



En este tratamiento se usó la concentración de Bencil Amino Purina de 6mg/L para el medio de cultivo.

Según la Figura Nro. 1 Muestra que la variedad O Neal (V1M1) tuvo un porcentaje de 44,4% de Regeneración, mostrando mejores resultados que la variedad Misty.

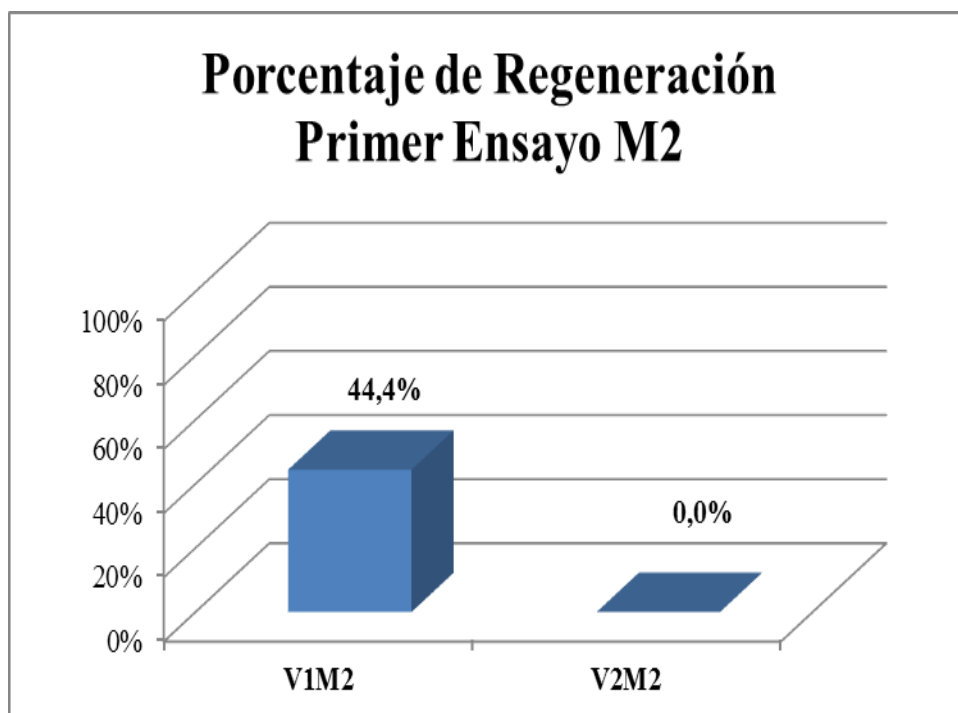
La variedad Misty (V2M1) obtuvo un porcentaje de regeneración del 22,2%.

Ambos tratamientos presentaron regeneración.

4.1.1.1.5.2 Porcentaje de Regeneración del Primer Ensayo M2

Figura Nº 2

Porcentaje de Regeneración del Primer Ensayo M2



En este Tratamiento se usó la concentración de Bencil Amino Purina de 9 mg/L en el medio de Cultivo

Uno de los tratamientos presentó Regeneración.

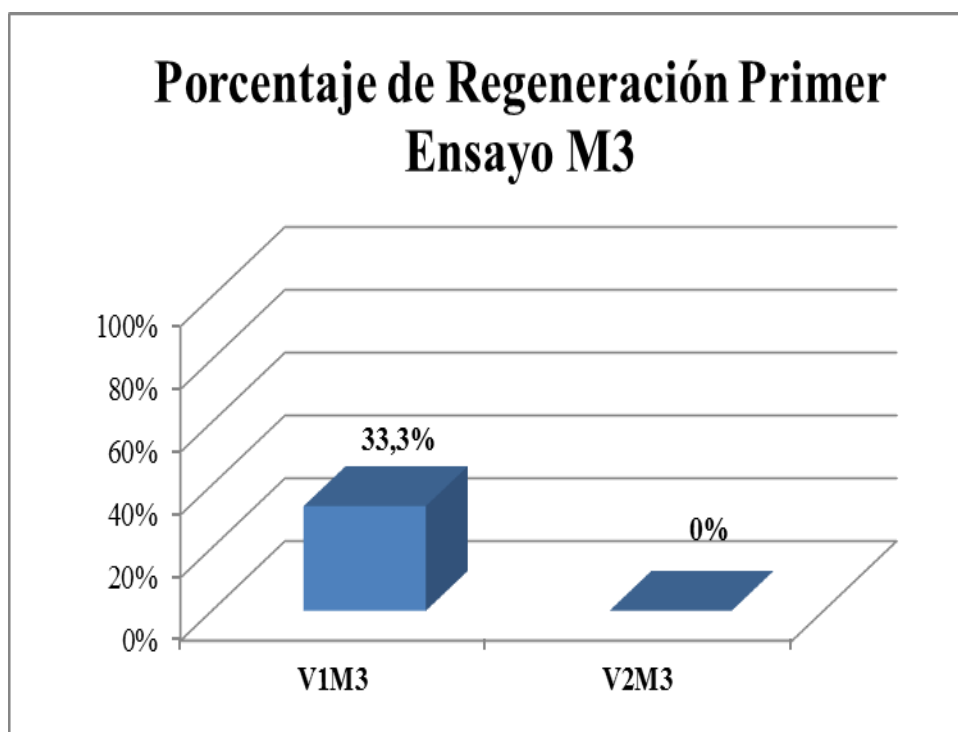
El porcentaje de regeneración de la variedad O Neal (V1M2) fue del 44,4%.

Se obtuvo un 0% de regeneración en la variedad Misty (V2M2).

4.1.1.1.5.3 Porcentaje de Contaminación del Primer Ensayo M3

Figura Nº 3

Porcentaje de Regeneración del Primer Ensayo M3



Para este Tratamiento se utilizó la concentración de Bencil Amino Purina a 15mg/L en el medio de cultivo.

Uno de los tratamientos presento porcentaje de regeneración.

El porcentaje de regeneración de la variedad O Neal (V1M3) fue del 33,3%.

El porcentaje de regeneración de la variedad Misty (V2M3) fue del 0%.

La variedad que respondió mejor al Tratamiento fue la variedad O Neal

4.1.1.2 Resultados de Contaminación de Arándano en la Fase de Establecimiento

4.1.1.2.1 Análisis del Cuadro de ANOVA de contaminación del Primer Ensayo

Cuadro Nº 11

Cuadro de ANOVA de Contaminación del Primer Ensayo

FV	gl	Sc	CM	Fc	Ft5	Ft1
Total	17	16,44				
Rep	2	0,78	0,39	1,2	4,1	7,56
Trat	5	12,44	2,49	7,7	3,33	5,64
Error	10	3,22	0,32			
F Var	1	3,6	3,56	11,0	4,96	10,04
Fmc	2	5,4	2,72	8,4	4,1	7,56
Mc/va	2	3,44	1,72	5,3	4,1	7,56
CV						3,7

Según el cuadro de ANOVA sí existen diferencias significativas debido a que la Fc es mayor a la Ft 5%

		I	II	III	E	x
V1	M1	33,33	0	33,33	66,66	22,2
	M2	66,66	33,33	33,33	133,32	44,4
	M3	33,33	33,33	33,33	99,99	33,3
V2	M1	66,66	66,66	66,66	199,98	66,7
	M2	100	100	100	300	100,0
	M3	0	0	66,66	66,66	22,2
	b10	299,98	233,32	333,31	866,61	288,9
					48,15	16,0

4.1.1.2.2 Análisis de Diferencia de Medias de los Tratamientos de Contaminación Primer Ensayo.

Cuadro Nº 12

Diferencia de Medias Tratamientos Contaminación Primer Ensayo.

Nº	TRAT.	DESCRIPCION	CM	RANGO
1	V2M2	Variedad Misty + Medio 2 de cultivo BAP 9 mg/L	100	a
2	V2M1	Variedad Misty + Medio 1 de cultivo BAP 6 mg/L	66,7	a
3	V1M2	Variedad O Neal + Medio 2 de cultivo BAP 9 mg/L	44,4	b
4	V1M3	Variedad O Neal + Medio 3 de cultivo BAP 15 mg/L	33,3	b
5	V1M1	Variedad O Neal + Medio de cultivo BAP 6 mg/L	22,2	b
6	V2M3	Variedad Misty + Medio 3 de cultivo BAP 15 mg/L	22,2	b

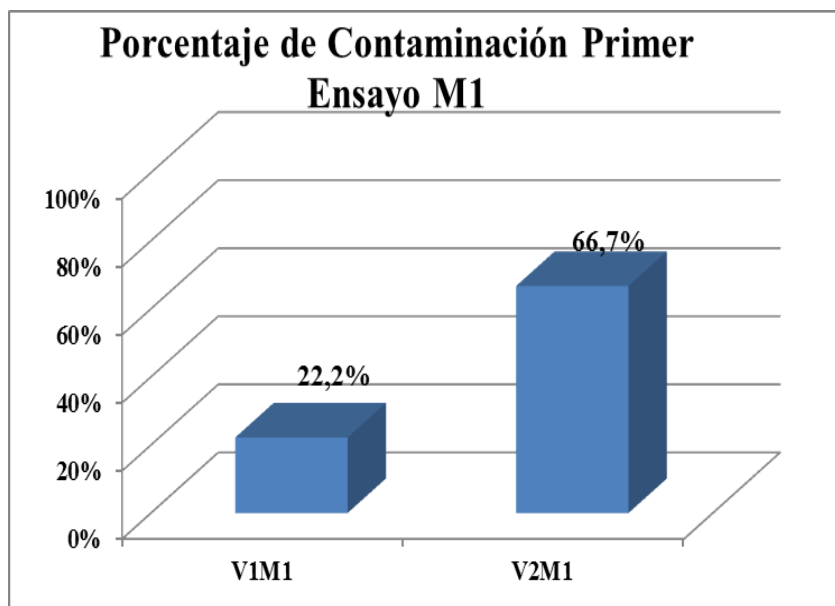
En el cuadro Nro. 12 para la diferencia de medias significativas se puede apreciar que el Tratamiento V2M2 de la Variedad Misty presentó un índice de CM de 100 diferenciándose de los demás tratamientos

Los tratamientos V1M1 y V2M3. Presentaron un CM de 22,2 siendo éstos los más bajos en sus resultados de contaminación.

4.1.1.2.3 Porcentaje de Contaminación del Primer Ensayo M1

Figura Nº 4

Porcentaje de Contaminación del Primer Ensayo M1



En este tratamiento se utilizó para el medio de cultivo la concentración de 6mg/L de Bencil Amino Purina.

Ambos tratamientos presentaron contaminación.

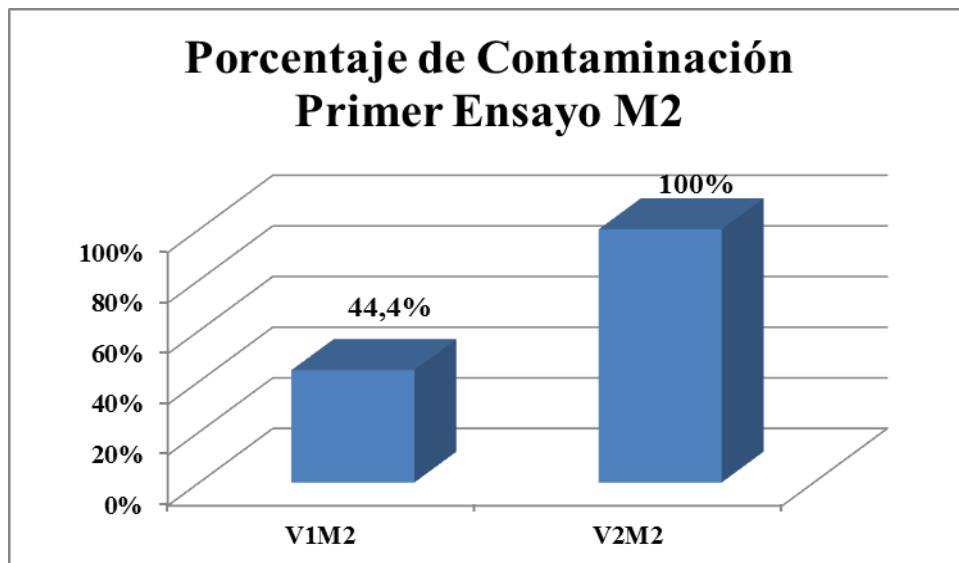
El porcentaje más alto de contaminación fue de la variedad Misty (V2M1) obteniendo un resultado de 66,7% de muestras contaminadas.

La variedad O Neal presentó un 22,2% de contaminación en este tratamiento.

4.1.1.2.4 Porcentaje de Contaminación del Primer Ensayo M2

Figura Nº 5

Porcentaje de Contaminación del Primer Ensayo M2



En este tratamiento se utilizó para el medio de cultivo una concentración de Bencil Amino Purina 9 mg/L

Ambos tratamientos presenta contaminación.

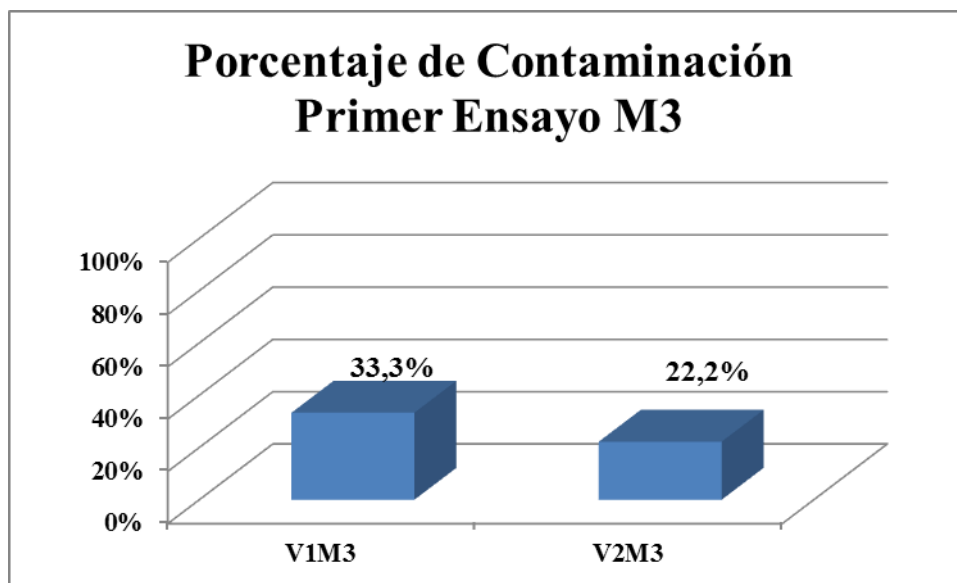
La variedad Misty (V2M2) presento un 100% de contaminación en el tratamiento.

En la variedad O Neal el porcentaje de contaminación fue de 44,4% de las muestras del Tratamiento.

4.1.1.2.5 Porcentaje de Contaminación del Primer Ensayo M3

Figura Nº 6

Porcentaje de Contaminación del Primer Ensayo M3



En este tratamiento se utilizó en el medio de cultivo una concentración de Bencil Amino Purina de 15mg/L.

Ambos tratamientos presentan contaminación en el M3.

La variedad que presentó un mayor porcentaje de contaminación fue la variedad O Neal (V1M3) con un 33,3%, mientras tanto la variedad Misty (V2M3) presentó un porcentaje 22,2%.

4.1.2 Segundo Ensayo

El Segundo Ensayo se realizó el 3 de Octubre del 2016 hasta el día 24 de Octubre del 2016.

4.1.2.1 Resultados de Regeneración de Arándano en la Fase de Establecimiento Segundo Ensayo.

Cuadro Nº 13

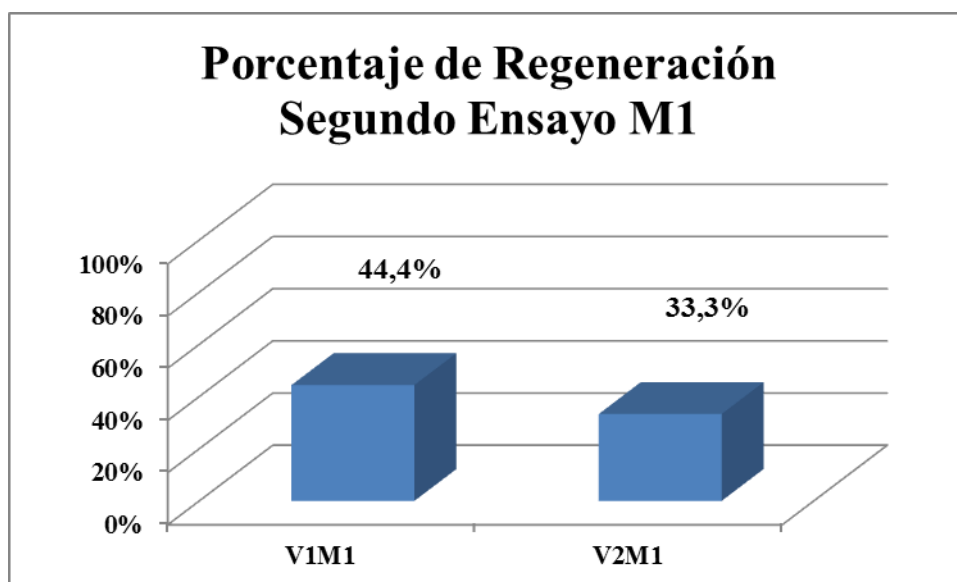
Análisis Cuadro de La Varianza Regeneración Segundo Ensayo

FV	gl	Sc	CM	Fc	Ft5	Ft1
Total	17	13,11				
Rep	2	5,44	2,72	5,2	4,1	7,56
Trat	5	2,44	0,49	0,9	3,33	5,64
Error	10	5,22	0,52			
F Var	1	0,0	0,00	0,0	4,96	10,04
Fmc	2	1,4	0,72	1,4	4,1	7,56
Mc/va	2	1,00	0,50	1,0	4,1	7,56
CV						1,7

Según el Cuadro Nro.13 de la Varianza no existe diferencias Significativas debido a que la Fc es menor que la Ft.

4.1.2.1.1 Análisis del Porcentaje de Regeneración del Segundo ensayo M1

Figura Nro.7
Porcentaje de Regeneración Segundo Ensayo M1



En la figura Nro. 7 podemos observar que la Variedad O Neal (V1M1) tuvo un porcentaje de regeneración de 44,4%

Ambos tratamientos presentan regeneración.

La variedad Misty (V2M1) tuvo un porcentaje de regeneración de 33,3%

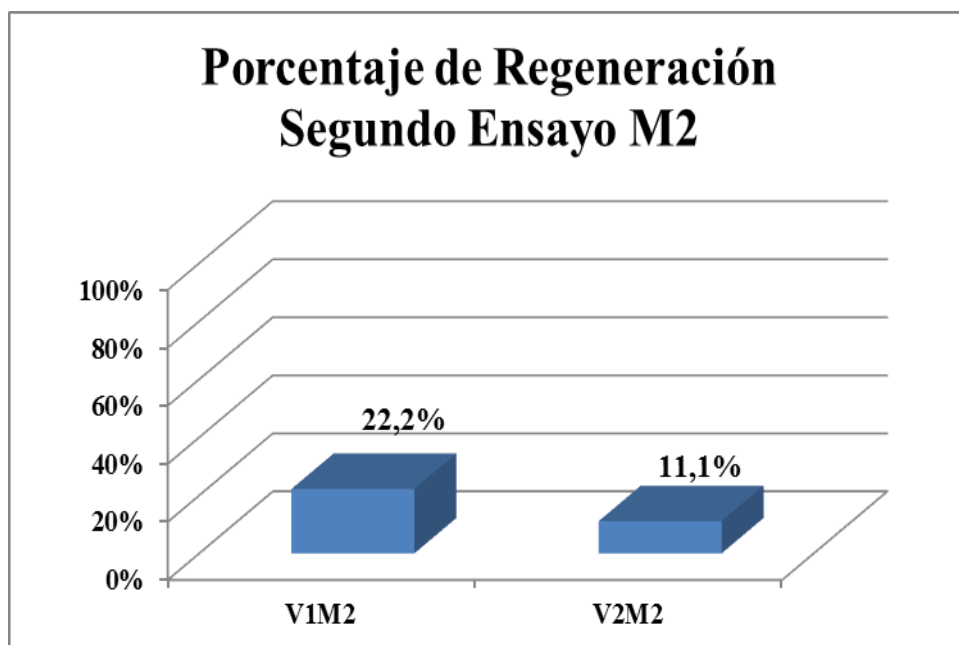
El medio de cultivo M1 del Segundo Ensayo tiene una concentración de Bencil Amino Purina de 3 mg/L

En este medio de cultivo La variedad que mejor sobresalió fue la variedad O Neal porque presento mayor porcentaje de regeneración que la variedad Misty

4.1.2.1.2 Análisis del Porcentaje de Regeneración del Segundo ensayo M2

Figura Nro.8

Porcentaje de Regeneración Segundo Ensayo M2



El medio de cultivo M2 del segundo ensayo tiene en su composición 6 mg/L de Bencil Amino Purina.

Ambos tratamientos presentan porcentajes de regeneración.

En este ensayo la variedad O Neal (V1M2) mostro un porcentaje de regeneración de 22,2%.

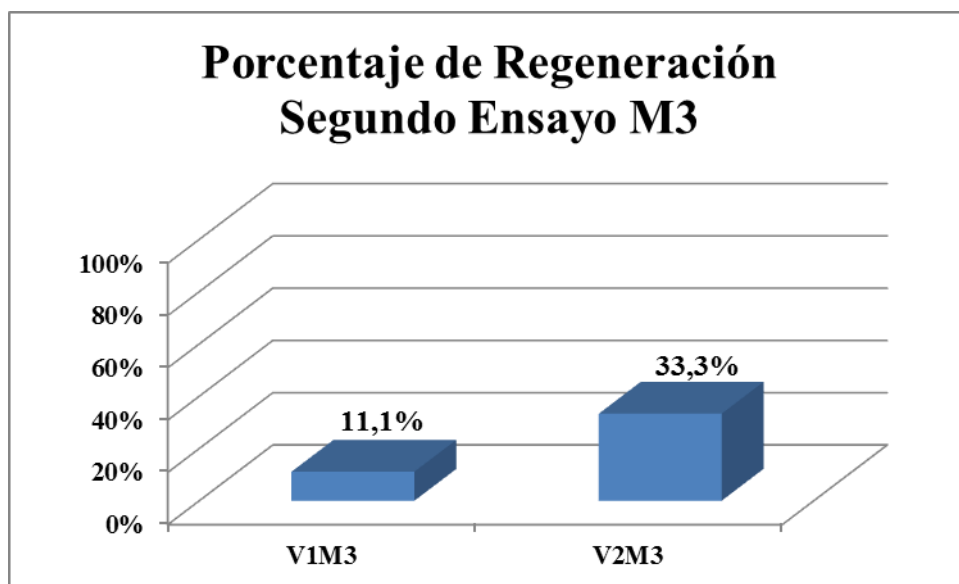
Mientras tanto la Variedad Misty (V2M2) dio un porcentaje de 11,1% de regeneración.

En este tratamiento se repitió el tratamiento del primer ensayo M2 con la concentración de BAP.

4.1.2.1.3 Análisis del Porcentaje de Regeneración del Segundo ensayo M3

Figura Nro.9

Porcentaje de Regeneración Segundo Ensayo M3



En la figura Nro. 9 indica que el tratamiento V1M3 variedad O Neal presentó un porcentaje de regeneración del 11,1% y el tratamiento V2M3 de la variedad Misty tuvo un porcentaje de regeneración de 33,3%.

En este medio de cultivo M3 se realizó la concentración de 12 mg/L de Bencil Amino Purina.

Ambos tratamientos presentaron porcentaje de regeneración.

4.1.2.2 Resultados de Contaminación del Arándano en la Fase de Establecimiento Segundo Ensayo.

Cuadro Nº 14

Análisis Cuadro de La Varianza Contaminación Segundo Ensayo

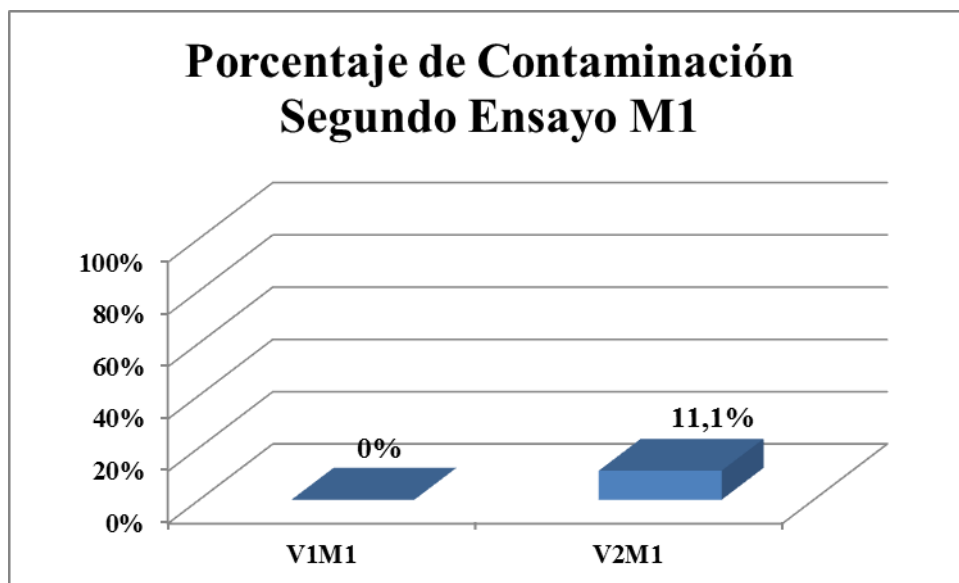
FV	gl	Sc	CM	Fc	Ft5	Ft1
Total	17	13,61				
Rep	2	2,11	1,06	2,7	4,1	7,56
Trat	5	7,61	1,52	3,9	3,33	5,64
Error	10	3,89	0,39			
F Var	1	0,5	0,50	1,3	4,96	10,04
Fmc	2	4,1	2,06	5,3	4,1	7,56
Mc/va	2	3,00	1,50	3,9	4,1	7,56
CV						2,2

Según el cuadro Nro.14 de la Varianza si existe diferencias significativas debido a que la Fc es mayor que la Ft5% y la Ft1%

4.1.2.2.1 Análisis del Porcentaje de Contaminación del Segundo ensayo M1

Figura N°10

Análisis del Porcentaje de Contaminación del Segundo Ensayo M1



En la figura Nro. 10 refleja el porcentaje de contaminación del M1 del segundo ensayo la concentración de este medio es de 3 mg/L de Bencil Amino Purina.

La contaminación se hizo presente en uno de los tratamientos del M1.

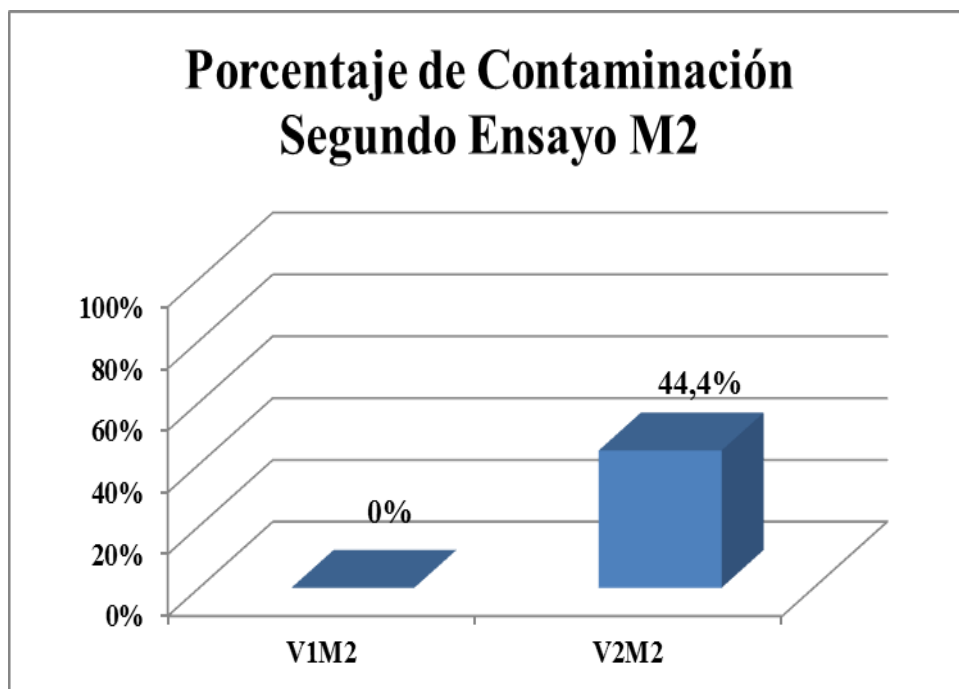
La variedad O Neal (V1M1) no presentó porcentaje de contaminación debido a que se cumplieron correctamente los pasos del protocolo del laboratorio.

La variedad Misty V2M1 presenta un 11% de contaminación.

4.1.2.2.2 Análisis del Porcentaje de Contaminación del Segundo Ensayo M2

Figura Nº11

Análisis del Porcentaje de Contaminación del Segundo Ensayo M2



En la figura Nro. 11 el medio de cultivo M2 tiene la siguiente concentración de Bencil Amino Purina 6 mg/L.

La contaminación se hizo presente en uno de los tratamientos con el M2

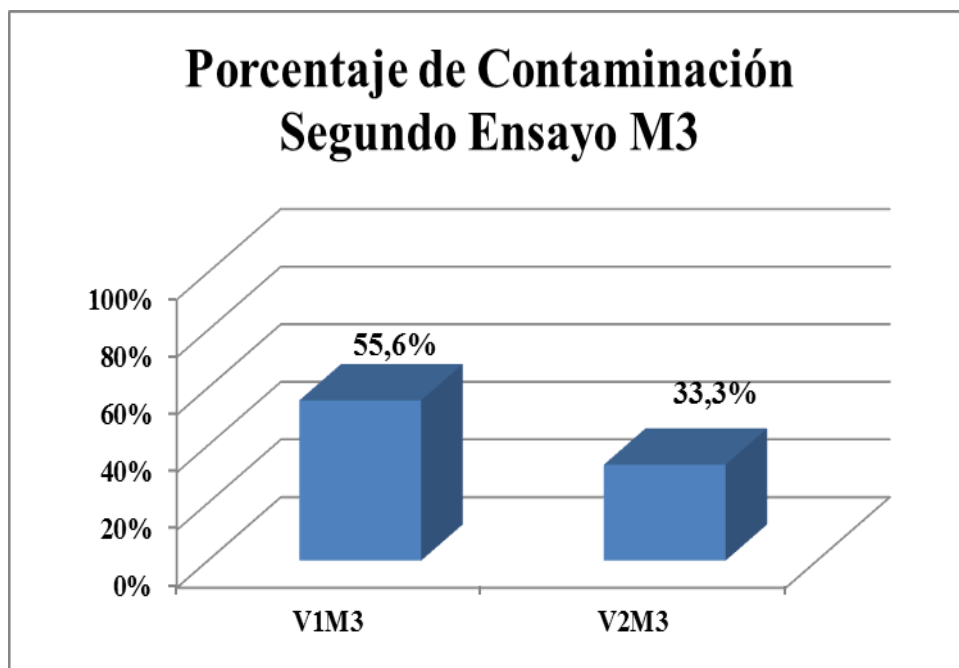
La Variedad O Neal V1M2 no presentó contaminación en este tratamiento.

La variedad Misty presenta un porcentaje de 44.4% de contaminación en el tratamiento.

4.1.2.2.3 Análisis del Porcentaje de Contaminación del Segundo Ensayo M3

Figura №12

Análisis del Porcentaje de Contaminación del Segundo Ensayo M3



En la Figura Nro. 12 muestra resultados de contaminación en el M3 con la concentración de 12 mg/L de Bencil Amino Purina.

En ambos tratamientos se manifestó la contaminación.

La variedad O Neal (V1M3) presento un 55,6% de contaminación mientras tanto la variedad Misty (V2M3) presento un 33,3% de contaminación en este tratamiento.

4.1.3 Tercer Ensayo

El tercer ensayo se realizó el 28 de Noviembre del 2016 hasta el 22 de Diciembre del 2016

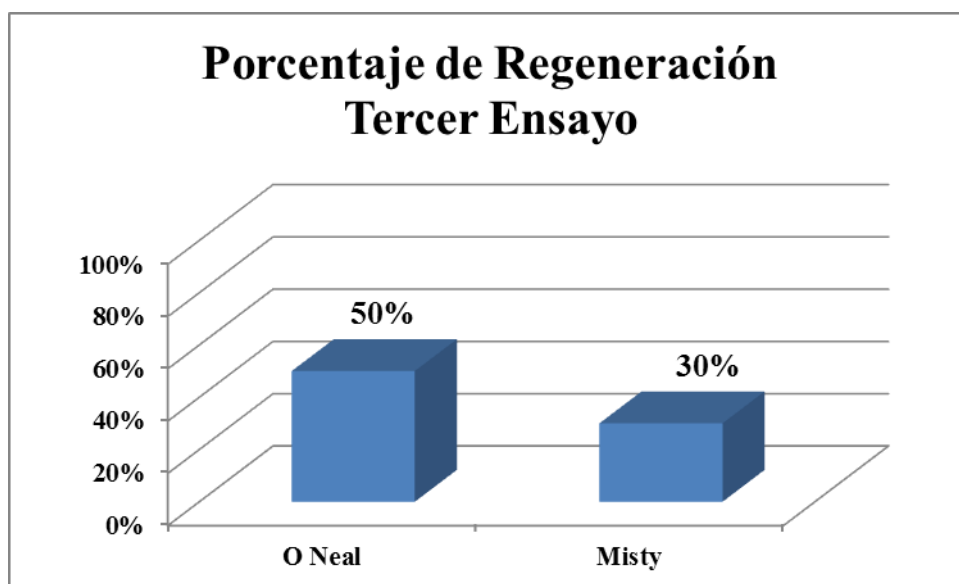
En este ensayo se decidió utilizar la concentración de 6 mg/L. para las dos variedades en estudio y se recogieron los siguientes datos de regeneración y contaminación.

Se realizaron 20 muestras por cada una de las variedades.

4.1.3.1 Análisis del Porcentaje de Regeneración en Ambas Variedades

Figura №13

Porcentaje de Regeneración Tercer Ensayo



Ambos tratamientos presentaron porcentajes de regeneración

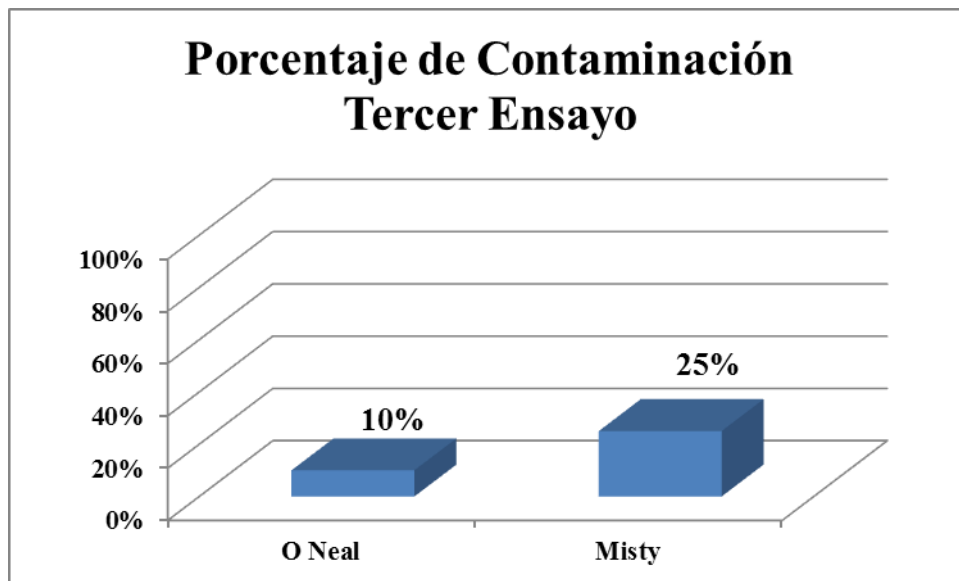
La variedad O Neal Presento un 50% de regeneración en el tercer ensayo.

La variedad Misty presento un 30 % de Regeneración en el tercer ensayo

4.1.3.2 Análisis del Porcentaje de Contaminación en Ambas Variedades

Figura №14

Porcentaje de Contaminación Tercer Ensayo



En ambos tratamientos se presentó contaminación.

La variedad Misty presentó un 25% de contaminación en el tratamiento.

La variedad O Neal presentó un porcentaje del 10% de contaminación en el tratamiento.

4.2 DISCUSIÓN.

En el presente trabajo se realizaron 3 ensayos, los dos primeros eran similares en el procedimiento de trabajo pero se diferenciaban en la concentración de medios de cultivo solamente eran iguales los medios de cultivos los Tratamientos V1M1y V2M1 del Primer Ensayo con los tratamientos V1M2 y V2M2 del Segundo Ensayo.

Para poder acelerar la fotosíntesis de los explantes todos los tratamientos fueron sometidos a 16 horas luz por día, mediante un temporizador que activa todos los programas, además la temperatura de la sala de crecimiento es de 23 grados centígrados, en todos los ensayos no se presentó fenolización de los medios de cultivo, por lo tanto no se llevó a cámara oscura.

En el Primer Ensayo los mejores resultados de los tratamientos en cuanto a la regeneración en porcentajes fue para la variedad O Neal en todos los tratamientos M1 44,4%, M2 44,4%, M3 33,3%, la variedad Misty presentó regeneración solamente en el medio M1 22,2% la concentración en este medio de Bencil Amino Purina fue de 15 mg/L La contaminación se hizo presente en esta variedad con un 100% en el V2M2 debido a errores protocolares que se realizaron en el ensayo.

En el Segundo Ensayo la variedad que respondió mejor a los tratamientos fue la variedad O Neal, M1 44,4%, M2 33,3%, M3 33,3% mientras tanto la Variedad Misty M1 33,3%, M2 11,1%, M33,3% en este ensayo sí hubieron respuesta en los tratamientos de regeneración para la variedad Misty; en cuanto a la contaminación, la variedad O Neal presentó en sus tratamientos un porcentaje de 55,6% en el medio 3 pero no se presentó grado de contaminación en los medios 1 y 2; en la variedad Misty los porcentajes de contaminación fueron en el (M1)11,1%, M2 44,4%, M3 33,3% lo que nos demuestra que los procedimientos de protocolo estuvieron mejores en comparación al Primer Ensayo de la investigación, este aspecto es muy importante al momento de realizar este tipo de trabajo de investigación de la técnica de cultivo in vitro, ahora cabe aclarar que los porcentajes de contaminación estarán presentes en

muchas oportunidades cuando se esté trabajando en este medio es importante reducir al máximo esta variable para que los resultados sean los mejores.

En el Tercer Ensayo se utilizó la concentración de Bencil Amino Purina 6 mg/L para analizar su desenvolvimiento nuevamente para el medio de cultivo en ambas variedades, presentando un porcentaje de regeneración en la variedad O Neal de 50% de los explantes, en la variedad Misty es menor el porcentaje llegando a un 25%; en cuanto a los datos de contaminación, en la variedad Misty se registró un 25% y en la variedad O Neal un 10% menor en comparación a la variedad Misty.

Los métodos de desinfección dan a entender que son los correctos (30 segundos en alcohol al 70% y por 10 minutos en Hipoclorito de Sodio al 4%) ya que no existía mucha contaminación del explante, sino que la contaminación es protocolar.

Los mejores resultados en general se presentaron con Bencil Amino Purina de 6 mg/L de medio de cultivo, pero es mejor seguir experimentando en concentraciones bajas no mayores a está para la variedad O Neal, para mejorar con los resultados de regeneración y para poder continuar con las otras fases de la técnica de Cultivo *in vitro*.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- Los medios de cultivos respondieron adecuadamente, el medio WPM (Woody Plant Medium) con la aplicación de la fitohormona Bencil Amino Purina.
- Los tratamientos efectuados fueron los correctos, indicándonos que los mejores resultados en la regeneración para ambas variedades son aquéllos que se utilizaron en concentraciones más bajas de Bencil Amino Purina 3 mg/L; 6 mg/L y 9 mg/L.
- De todos los tratamientos evaluados se pudo concluir que el mejor de todos es el medio de cultivo con la concentración de Bencil Amino Purina de 6 mg/L. para la variedad O Neal obteniendo en el primer ensayo un porcentaje de regeneración de 44,4%; en el segundo ensayo 22,2% y en el tercer ensayo 50%, para la variedad Misty en el segundo ensayo la concentración de 3 mg/L y el medio 12 mg/L se obtuvieron en ambos tratamientos un porcentaje de regeneración del 33,3% y en el tercer ensayo la concentración de 6 mg/L se obtuvo un 25% de regeneración.
- La contaminación que se hizo presente en el trabajo de investigación fue debido a errores protocolares que se cometieron en el trabajo, estos son muy comunes cuando se realiza la micropropagación de plantas mediante la técnica de Cultivo in vitro; la variedad que presentó mayores porcentajes de contaminación fue la variedad Misty.
- Para poder proceder a la siguiente etapa es muy importante primero concluir de forma correcta la Fase de establecimiento de los explantes del Arándano de las dos variedades en estudio, este procedimiento se debe realizar cuando se realiza el cultivo in vitro de cualquier material vegetal, no se pudo avanzar

más ya que no existía ningún trabajo a nivel nacional acerca de un protocolo de cultivo *in vitro* de cualquiera de las variedades.

5.2 RECOMENDACIONES

- Se recomienda cumplir rigurosamente el protocolo de laboratorio en la investigación para evitar muestras contaminadas y tener mayores resultados en la investigación.
- Para futuras investigaciones en estas variedades de arándano O Neal y Misty recomendamos usar la fitohormona Bencil Amino Purina pero en concentraciones distintas a las analizadas en esta investigación, en preferencia usar entre 3 mg/L y 9 mg/L en los medios de cultivo.
- El pH de 5.7 en el medio de cultivo que es el recomendado para ser utilizado en esta técnica de propagación, como equipo de investigación sugerimos usar menores niveles de pH mencionado anteriormente, niveles entre 4.0 a 5.5 éstos deberán ser analizados a futuro para investigar con las variedades O Neal y Misty.
- Mantener el proceso de desinfección de los materiales vegetales de alcohol al 70% por 30 segundos y en Hipoclorito de Sodio al 4% por 10 minutos, éstos se realizan en la Fase de Establecimiento de Cultivo *In Vitro*.
- Fomentar el estudio de las técnicas no convencionales para la obtención de plantas o plantines en la universidad, ya que la producción sin tierra es una tendencia futurista debido a los cambios climáticos que ocasiona pérdidas en el agro.
- Se recomienda seguir con la investigación en las fases posteriores a la Fase de Establecimiento, como ser: Multiplicación, Enraizamiento y Aclimatación para poder evaluar que el método *in vitro* sí es viable y satisface las necesidades de los productores con plantas sanas.