

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



TRES TRATAMIENTOS DE MANEJO POSCOSECHA DE FRUTOS Y GIBERELINAS EN SEMILLAS DE *Vaccinium corymbosum* (ARÁNDANO) PARA SU GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO *in vitro* EN DOS MEDIOS DE CULTIVO

Tesis presentada por la Bachiller:

Ramírez Valdivia, Margaret Lorens

Para optar el Título Profesional de

Ingeniero Biotecnólogo

Asesor:

Mg. Bardales Álvarez, Roxana

AREQUIPA - PERÚ

2019

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Programa Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°. 2019000002244

N° Trámite en Fac. 421-2019

Fecha Recep. Fac. 14-01-2019

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: **RAMIREZ VALDIVIA, Margarett Lorens**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

"PRE TRATAMIENTO DE FRUTOS EN EL CULTIVO in vitro DE SEMILLAS Y MICROPROPAGACION DE Vaccinium corymbosum (Arándano) PARA TRATAMIENTOS DE INDUCCION A POLIPLIIDIA"

DICTAMINADORES: 1) Blgo. Carlos Eitel Iván Paz Aliaga 2) Ing. Cinthia Córdova Barrios

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis presentado por la recurrente, cumplimos con informar que se ha revisado, formulado las observaciones y corregido, sugiriendo cambiar el título a: "EVALUACION DE DIFERENTES TRATAMIENTOS PREGERMINATIVOS EN FRUTOS Y SEMILLAS PARA LA GERMINACION Y CRECIMIENTO in vitro DE Vaccinium corymbosum (Arándano)" luego de lo cual consideramos que se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.
Atentamente

FIRMAS:  

FECHA 28-03-19

ASESOR: Mgter. Roxana Bardales Álvarez

DICTAMEN ASESORÍA: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesora del trabajo de investigación presentado por las recurrentes, tengo a bien informar que luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes y debiendo cambiar el título a: "TRES TRATAMIENTOS DE MANEJO POSCOCECHA DE FRUTOS Y GIBERELINAS EN SEMILLAS DE Vaccinium corymbosum (ARANDANO) PARA SU GERMINACION Y CRECIMIENTO in vitro EN DOS MEDIOS DE CULTIVO", considero que el presente trabajo está APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.
Atentamente

FIRMA 

FECHA 16-03-19

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) Ing. Cinthia Córdova Barrios
2) Blgo. Carlos Eitel Iván Paz Aliaga
3) Dr. Fredy Molina Rodríguez

DICTAMEN FINAL:

Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, es que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.
Atentamente

FIRMA 

FECHA 25-10-2019

JURADOS: PRESIDENTE ING. CINTHIA CORDOVA BARRIOS
VOCAL BLGO CARLOS JUAN PAZ ALIAGA
SECRETARIO DR. FREDY MOLINA RODRIGUEZ

FECHA 6/11/19

HORA 19.00

LOCAL C-401

FIRMA DEL DECANO 

FECHA

DEDICATORIA

A mi mamá, la persona que más quiero, con mucho amor y cariño le dedico todo mi esfuerzo y trabajo puesto para la realización de esta tesis.





AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a mi padre Dios por haber iluminado mi camino y darme su bendición.

En segundo lugar, a mi mamá la Dra. Durothy Valdivia Díaz y a mi hermano el Mg. Yosheff Ortiz Valdivia, por siempre haberme dado su fuerza y apoyo incondicional.

A mi asesora la Mg. Roxana Bardales por la guía y apoyo brindado para la realización de esta tesis.

Por último, a mis queridas amigas Stephanie, Rocío, Rosmery, Andrea y a mi querido Julio por la fuerza que me dió su cariño.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	iii
INTRODUCCIÓN	iv
OBJETIVOS	vi
HIPÓTESIS.....	vii
VARIABLES	viii
CAPITULO I	01
1. MARCO TEÓRICO.....	01
1.1. Arándano.....	01
1.2. Germinación	03
1.2.1. Germinación del Arándano según Rocha	04
1.2.2. Fases del proceso típico de germinación de semillas según Pérez.....	04
1.2.3. Factores que afectan la germinación	06
1.3. Morfología de la semilla según	07
1.3.1. La testa.....	07
1.3.2. Endospermo	07
1.3.3. Embrión	07
1.4. Dormición y latencia de las semillas.....	09
1.4.1. Dormición impuesta por las cubiertas seminales.....	10
1.4.2. Dormición embrionaria.....	11
1.5. Madurez de la semilla	11
1.6. Tratamientos pregerminativos más utilizados en semillas	12
1.7. Micropropagación	14
1.8. Medios de cultivo.....	14
1.8.1. Reguladores de crecimiento.....	16
CAPITULO II	18
2. MATERIALES Y MÉTODOS	18
2.1. Lugar de ejecución	18

2.2. Materiales.....	18
2.3. Métodos	19
CAPITULO III:	34
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
3.1. Porcentaje y tiempo de germinación de los tratamientos pregerminativos aplicados al fruto de <i>Vaccinium corymbosum</i> (Arándano)	34
3.2. Porcentaje y tiempo de germinación de los tratamientos pregerminativos aplicados a semillas de <i>Vaccinium corymbosum</i> (Arándano)	42
3.3. Porcentaje de emergencia de los tratamientos pregerminativos aplicados al fruto de <i>Vaccinium corymbosum</i> (Arándano)	50
3.4. Efecto de tratamiento de semillas de <i>Vaccinium corymbosum</i> (arándano) con AG ₃ en el porcentaje de emergencia	59
3.5. Desinfestación de semillas con Hipoclorito de sodio.....	72
3.6. Efecto de la concentración de FeEDTA en los medios WP y MS	76
CONCLUSIONES	91
RECOMENDACIONES	93
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94
ANEXOS	

ÍNDICE TABLAS

	Pág.
<i>Tabla 2.1 Tratamientos aplicados al fruto de Vaccinium corymbosum (arándano).....</i>	22
<i>Tabla 2.2. Tratamientos aplicados a las semillas en etapa de establecimiento in vitro.....</i>	37
<i>Tabla 2.3. Tratamientos de desinfestación aplicados a semillas en etapa de establecimiento in vitro.....</i>	28
<i>Tabla 2.4. Concentración de los componentes FeEDTA en los medios MS y WP.....</i>	33
<i>Tabla 3.1. Número y Porcentaje de semillas de Vaccinium corymbosum (Arándano) germinadas, con 3 repeticiones por tratamiento aplicados a frutos hasta la semana 18.....</i>	37
<i>Tabla 3.2. Número y Porcentaje de germinación de semillas de Vaccinium corymbosum (Arándano), con 3 repeticiones por tratamiento aplicado a semillas hasta la semana 18.....</i>	44
<i>Tabla 3.3. Pruebas Multivariantes para tratamientos de Germinación de semilla y fruto.....</i>	48
<i>Tabla 3.4. Número y Porcentaje de emergencia de semillas con cotiledones de Vaccinium corymbosum (Arándano) con 3 repeticiones por tratamiento aplicado a frutos hasta la semana 18.....</i>	51
<i>Tabla 3.5. Número y porcentaje de semillas emergidas de Vaccinium corymbosum (Arándano) con hojas verdadera con tres repeticiones hasta la semana 18.....</i>	54
<i>Tabla 3.6. Número promedio de semillas emergidas considerando número de hojas verdaderas en la semana 18, proveniente de tratamiento a frutos.....</i>	55
<i>Tabla 3.7. Número y Porcentaje de semillas emergidas con nudos de Vaccinium corymbosum (Arándano) con 3 repeticiones por tratamiento aplicado a frutos hasta la semana 18.....</i>	57
<i>Tabla 3.8. Longitud (mm) promedio de tallos de semillas emergidas de</i>	

<i>Vaccinium corymbosum</i> (Arándano) con 3 repeticiones por tratamiento aplicado a frutos hasta la semana 18.....	58
Tabla 3.09. Número y Porcentaje de emergencia de semillas de <i>Vaccinium corymbosum</i> (Arándano) con cotiledones, con 3 repeticiones por tratamiento aplicado a semillas hasta la semana 18.....	59
Tabla 3.10. Número y Porcentaje de semillas emergidas de <i>Vaccinium corymbosum</i> (Arándano) con hojas verdaderas, con 3 repeticiones por tratamiento aplicado a semillas hasta la semana 18.....	61
Tabla 3.11. Número promedio de semillas emergidas por número de hojas verdaderas en la semana 18, proveniente de tratamientos a semillas.....	63
Tabla 3.12. Número y Porcentaje de semillas emergidas con nudos, de <i>Vaccinium corymbosum</i> (Arándano), con 3 repeticiones por tratamiento aplicado a semillas hasta la semana 18.....	64
Tabla 3.13. Longitud de tallos de <i>Vaccinium corymbosum</i> (Arándano) en mm. con 3 repeticiones por tratamiento aplicado a semillas hasta la semana 18.....	65
Tabla 3.14. Pruebas Multivariantes para emergencia de cotiledones.....	66
Tabla 3.15. Pruebas Multivariantes para hojas verdaderas.....	68
Tabla 3.16. Pruebas Multivariantes para nudos.....	71
Tabla 3.17. Número y porcentaje promedio de semillas contaminadas por bacterias en los tratamientos de desinfección A y B.....	73
Tabla 3.18. Porcentaje total de contaminación tanto por Bacterias como por Hongos en los tratamientos de desinfección aplicados a las semillas de <i>Vaccinium corymbosum</i> (arándano).....	75
Tabla 3.19. Número de hojas promedio por tratamiento (Medio de cultivo) hasta la décima semana. MS: Murashige & Skoog 1982 con macroelementos a 1/3 de la concentración original. WP: Woody Plant, Lloyd & Brent 1981).....	76
Tabla 3.20. Número promedio de nudos por repetición por tratamiento hasta la sexta semana. MS: Murashige & Skoog 1982), MS/3:	

	<i>MS con macroelementos a 1/3 de la concentración original. WP: Woody Plant, Lloyd & Brent 1981)</i>	79
Tabla 3.21.	<i>Longitud promedio de tallos (mm) al inicio y al final de su cultivo in vitro (10 semanas) en medios MS y WP. MS: Murashige & Skoog 19862), MS: con macroelementos a 1/3 de la concentración original. WP: Woody Plant, Lloyd & Brent (1980)</i>	81
Tabla 3.22.	<i>Análisis de ANOVA para los diferentes medios de cultivo y número de hojas</i>	86
Tabla 3.23.	<i>Promedio de los diferentes medios de cultivos y el número de nudos</i>	87
Tabla 3.24.	<i>Análisis de ANOVA para los diferentes medios de cultivo y el promedio de nudos</i>	87
Tabla 3.25.	<i>Estadísticos descriptivos aplicados a los distintos medios de cultivo y la longitud de los tallos</i>	88
Tabla 3.26.	<i>Prueba de hipótesis</i>	89

ÍNDICE FIGURAS

<i>Figura 1.1. Tipos de germinación. Izquierda: germinación epigea. (Espinillo), derecha: germinación hipogea. (mato).....</i>	<i>04</i>
<i>Figura 1.2. Germinación. a: dos días después de la emergencia de la radícula, b: 4 días, c: 6 días, d: 10 días, f: 15 días, liberación de la testa, g: 18 días, plántula con cotiledones libres y verdes (X15).....</i>	<i>05</i>
<i>Figura 2.1. Tratamientos aplicados al fruto de Vaccinium corymbosum</i>	<i>24</i>
<i>Figura 2.2. Arándanos frescos, obtenidos del mercado San Camilo</i>	<i>25</i>
<i>Figura 2.3. Semillas obtenidas. a) semillas sin selección b) semillas seleccionadas por coloración</i>	<i>25</i>
<i>Figura 2.4. Semillas obtenidas por flotación. a) Prueba de flotación b) semillas viables seleccionadas</i>	<i>26</i>
<i>Figura 2.5. Tratamientos de AG₃ aplicados a la semilla de Vaccinium corymbosum (Arándano).....</i>	<i>27</i>
<i>Figura 2.6. Proceso de desinfestación de semillas de Vaccinium corymbosum (arándano).....</i>	<i>29</i>
<i>Figura 2.7. Semillas en bolsas de gasa estéril listas para desinfestación.....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 2.8. Material listo para desinfestación y siembra dentro de cámara de flujo laminar.....</i>	<i>31</i>
<i>Figura 2.9. Semillas desinfestadas listas para siembra en medio WP.....</i>	<i>31</i>
<i>Figura 3.1. Germinación Arándano tratamiento 3: a: emergencia de la radícula (22 días); b: plántula de Arándano con cotiledones (40 días)</i>	<i>34</i>
<i>Figura 3.2. Germinación de los tratamientos aplicados al fruto (T1 y T2) (Control y madurados con etileno) a la quinta semana. Izquierda tratamiento 1 (no se observa germinación), derecha tratamiento 2 (se observa germinación).....</i>	<i>35</i>

<i>Figura 3.3. Germinación del Tratamiento 3 aplicado al fruto (fermentación). a: presencia de semillas germinadas (quinta semana), b: presencia de cotiledones (décima semana).....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 3.4. Germinación tratamiento 4 aplicado al fruto (con frio) a la quinta semana</i>	<i>36</i>
<i>Figura 3.5. Porcentaje de germinación de tratamientos aplicados a frutos de Vaccinium corymbosum (Arándano) (T1: maduración del fruto al ambiente), T2: maduración del fruto con etileno, T3: maduración del fruto en fermentación y T4: frutos tratados con frio), hasta la semana 18.....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 3.6. Plántulas de Vaccinium corymbosum (Arándano) obtenidas a los tres meses de siembra de sus semillas en medio de cultivo WP. Tratamientos aplicados al fruto 1,2, 3 y 4.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 3.7. Plántulas de Vaccinium corymbosum (Arándano) obtenidas mediante germinación in vitro a los tres meses de siembra. Tratamientos a semillas con AG3. T_s1= 0μM, T_s2= 5μM, T_s3= 10μM, T_s4= 15μM, T_s5= 20μM.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 3.8. Porcentaje de germinación de tratamientos aplicados a semillas de Vaccinium corymbosum (Arándano) hasta la semana 18.....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 3.9. Promedio de semillas germinadas para el tratamiento aplicado en frutos.....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 3.10 Promedio de semillas germinadas para el tratamiento aplicado a la semilla.....</i>	<i>50</i>
<i>Figura 3.11 Número y porcentaje de emergencia de semillas con cotiledones de Vaccinium corymbosum (Arándano) con 3 repeticiones por tratamiento aplicado a frutos hasta la semana 18.....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 3.12 Plántulas de Vaccinium corymbosum (Arándano), tratamiento 3.....</i>	<i>53</i>
<i>Figura 3.13 Porcentaje de semillas emergidas de Vaccinium corymbosum (Arándano) con hojas verdaderas, en tratamientos aplicados a</i>	

frutos hasta la semana 18.....	55
Figura 3.14 Porcentaje de emergencia de semillas con cotiledones de <i>Vaccinium corymbosum</i> (Arándano) con 3 repeticiones por tratamiento aplicado a semillas hasta la semana 18.....	60
Figura 3.15 Porcentaje de semillas emergidas de <i>Vaccinium corymbosum</i> (Arándano) con hojas verdaderas en tratamientos aplicados a semillas hasta la semana 18.....	62
Figura 3.16 Plántula de <i>Vaccinium corymbosum</i> (arándano) cultivado in vitro, proveniente de tratamiento con 5 μ M AG3 aplicado a semillas. Se observa distribución de hojas y nudos.....	64
Figura 3.17 Medias marginales del promedio de semillas emergidas para el tratamiento aplicado en frutos.....	68
Figura 3.18 Medias marginales del promedio de semillas emergidas para el tratamiento aplicado a la semilla.....	68
Figura 3.19 Medias marginales del promedio de hojas verdaderas para el tratamiento aplicado en frutos.....	79
Figura 3.20 Medias marginales del promedio de hojas verdaderas para el tratamiento aplicado a la semilla.....	70
Figura 3.21 Influencia de tratamiento de semillas en el porcentaje de contaminación total de bacterias en las semillas de <i>Vaccinium corymbosum</i> (Arándano).....	70
Figura 3.22 Número de hojas promedio por tratamiento con medios de cultivo MS y WP, durante 10 semanas.....	74
Figura 3.23 Número promedio de hojas que incrementaron por plántula por tratamiento. MS(*1) y WP(*1): FeEDTA (FeSO ₄ .7H ₂ O:27.8 mg/L, Na ₂ EDTA: 37.3 mg/L). MS*2 y WP*2: FeEDTA (FeSO ₄ .7H ₂ O: 55.6 mg/L, Na ₂ EDTA: 74.6 mg/L).....	77
Figura 3.24 Plántulas de <i>Vaccinium corymbosum</i> (arándano) a las 10 semanas de cultivo in vitro en medios MS 1/3 y WP.....	78
Figura 3.25 Promedio de número de nudos por tratamiento. MS(*1) y WP(*1): FeEDTA (FeSO ₄ .7H ₂ O:27.8 mg/L, Na ₂ EDTA: 37.3 mg/L). MS*2 y WP*2: FeEDTA (FeSO ₄ .7H ₂ O: 55.6 mg/L,	

<i>Na₂EDTA: 74.6 mg/L).....</i>	<i>78</i>
<i>Figura 3.26 Número de nudos promedio que incrementaron por plántula por tratamiento. MS(*1) y WP(*1): FeEDTA (FeSO₄.7H₂O:27.8 mg/L, Na₂EDTA: 37.3 mg/L. MS*2 y WP*2: FeEDTA (FeSO₄.7H₂O: 55.6 mg/L, Na₂EDTA: 74.6 mg/L).....</i>	<i>80</i>
<i>Figura 3.27 Longitud promedio de tallos en mm. a lo largo de 10 semanas de cultivo in vitro en medios MS y WP.....</i>	<i>82</i>
<i>Figura 3.28 Longitud de tallos obtenida después de 10 semanas de crecimiento en medios MS y WP a la concentración normal de FeEDTA.....</i>	<i>82</i>
<i>Figura 3.29 Longitud de tallos obtenida después de 10 semanas de crecimiento en medios MS y WP al doble de concentración de FeEDTA.....</i>	<i>84</i>
<i>Figura 3.30 Vaccinium corymbosum (arándano) cultivado in vitro en medio WP*1(FeEDTA a su concentración normal) con presencia de clorosis.....</i>	<i>84</i>
<i>Figura 3.31 Plántulas de Vaccinium corymbosum (arándano) obtenidas del cultivo in vitro en medio WP *2 (FeEDTA al doble de su concentración normal).....</i>	<i>84</i>

ABREVIATURAS

AG₃: Ácido giberélico

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

Fe: Elemento Químico Hierro

FeEDTA: Quelato de hierro

FeSO₄: Sulfato de Hierro (II)

HCL: Acido Clorhidrico

MS: Medio de cultivo Murashigue & Skoog

MS*1: Medio con concentración normal de FeEDTA

MS*2: Medio con doble concentración de FeEDTA

NaOH: Hidróxido de Sodio

NaClO: Hipoclorito de Sodio

WP: Medio de cultivo Woody Plant

WP*1: Medio con concentración normal de FeEDTA

WP*2: Medio con doble concentración de FeEDTA

RESUMEN

En la presente investigación se aplicó diferentes tratamientos poscosecha a frutos (maduración de frutos a ambiente, maduración con etileno, fermentación y refrigeración a 4°C), se extrajo las semillas y se sembraron *in vitro*, por otro parte se aplicó distintas concentraciones de giberelinas (0, 5, 10, 15, y 20 μM de AG_3) en semillas ya sembradas *in vitro* las cuales fueron extraídas de frutos madurados a ambiente. Todas las semillas fueron previamente desinfestadas antes de la siembra, para lo cual se determinó la concentración de Hipoclorito de sodio (1.25 % y 2.5 %) necesaria. Se evaluó la influencia de todos los tratamientos sobre el porcentaje de germinación de *Vaccinium corymbosum* (arándano) a través del tiempo, en condiciones de cultivo *in vitro*, así como su porcentaje de emergencia. Finalmente se evaluó la influencia de la concentración de FeEDTA (concentración normal y el doble) sobre el crecimiento *in vitro* de las plántulas en medios de cultivo MS y WP. De los tratamientos poscosecha, la fermentación de frutos (T3) presentó el mayor porcentaje de germinación (50 %), porcentaje de emergencia (cotiledones) (91 %) y emergencia de hojas verdaderas (95 %), por otro lado, de los aplicados a semillas el mejor fue el 5 μM AG_3 (T2) de germinación (55%), porcentaje de emergencia (cotiledones) (95 %) y emergencia de hojas verdaderas (69 %). Para el proceso de desinfestación de semillas con NaClO 2.5 % no se observó ningún tipo de contaminación. Para el efecto de la concentración de FeEDTA en los medios de WP y MS: el mejor resultado lo obtuvo el medio MS*2 con el desarrollo de 5 hojas, 5 nudos y una longitud de 13.47 mm, en 10 semanas de cultivo. Llegando a las

siguientes conclusiones; el mejor tratamiento aplicado al fruto fue la fermentación con $p < 0.05$, el mejor tratamiento aplicado a semillas fue el de $5 \mu\text{M AG}_3$ con $p < 0.05$. Para una desinfección óptima para este trabajo se encontró $\text{NaClO } 2.5\%$ como el más adecuado. En cuanto al crecimiento de plántulas, tamaño, número de hojas y apariencia el medio MS^*2 fue el que mostró mejores resultados, con $p < 0.05$ en longitud de tallos.

Palabras clave: Arándano, semilla, germinación, crecimiento, cultivo, *in vitro*



ABSTRACT

In the present research, different postharvest treatments were applied to fruits (ripening of fruits at room temperature, maturation with ethylene, fermentation and refrigeration at 4°C), the seeds were extracted and sown *in vitro*, on the other hand different variations of gibberellins were applied (0, 5, 10, 15, and 20 μM of AG₃) in seeds and sown *in vitro* which were extracted from ripe fruits at room temperature. All the seeds were previously disinfected before planting, for which the concentration of sodium hypochlorite (1.25% and 2.5%) was determined. The influence of all treatments on the germination percentage of *Vaccinium corymbosum* (cranberry) over time, under *in vitro* culture conditions, as well as its emergency percentage was evaluated. Finally, the influence of FeEDTA concentration (normal and double concentration) on the *in vitro* growth of seedlings in MS and WP culture media was evaluated. Of the post-harvest treatments, fruit fermentation (T3) had the highest germination percentage (50%), emergency percentage (cotyledons) (91%) and true leaf emergence (95%), on the other hand, of those applied The best seed was 5 μM AG₃ (T2) germination (55%), emergency percentage (cotyledons) (95%) and true leaf emergence (69%). For the process of disinfestation of seeds with 2.5% NaClO, no contamination was observed. For the effect of FeEDTA concentration in the WP and MS media: the best result was obtained by the MS * 2 medium with the development of 5 leaves, 5 knots and a length of 13.47 mm, in 10 weeks of culture. Coming to the following conclusions; the best treatment applied to the fruit was fermentation with $p < 0.05$, the best treatment applied to seeds was 5 μM AG₃ with $p < 0.05$. For optimal disinfestation for this work, 2.5% NaClO was found as the most appropriate. Regarding the growth of seedlings, size, number of leaves and appearance, the MS*2 medium showed the best results, with $p < 0.05$ in stem length.

Keywords: Blueberry, seed, germination, growth, culture, *in vitro*

INTRODUCCIÓN

Hoy en día existe una gran demanda de *Vaccinium corymbosum* (arándano) por sus propiedades nutricionales y antioxidantes^{1,2}, así como un creciente interés de utilizar métodos innovadores que permitan obtener plantas viables, libres de enfermedades y en buen estado y de manera rápida. Las deficiencias que conlleva el uso de propagación convencional a través de estacas pueden superarse utilizando técnicas de propagación *in vitro* que nos permita la rápida multiplicación de genotipos elite con alta capacidad de formación de raíces, mayor uniformidad de las progenies de las plantas y total independencia de los impactos ambientales o estacionales^{3,4}.

Dentro de las técnicas de cultivo de tejidos, la micropropagación es una técnica desarrollada para la producción a gran escala de plantas⁵, además permite obtener plantas en corto periodo de tiempo, en espacios reducidos, plantas libres de enfermedades y con la posibilidad de producir plantas durante todo el año.

En cuanto al establecimiento de cultivos *in vitro* mediante la siembra de semillas, éste ofrece grandes ventajas para la micropropagación, tales como: proporciona de una manera rápida plántulas que sirven como fuente de explantes para su posterior selección y micropropagación, además es una manera de conservar plántulas con variabilidad genética natural, y es un método que permite la germinación de semillas que de forma natural no lo hacen o es muy difícil de hacer en condiciones normales. Así mismo, la germinación *in vitro* cuenta con ventajas respecto a la producida en condiciones naturales, debido a que puede solucionar casos de inhibición total de la germinación, aumentar la tasa de germinación, reducir el tiempo y homogeneizar la germinación⁶. La germinación de la semilla es el procedimiento más frecuente para propagar las plantas superiores, y el que mejor asegura el mantenimiento o incluso el aumento de la biodiversidad.

En el presente trabajo de investigación se realizaron varios tratamientos tanto sobre frutos como sobre semillas de *Vaccinium corymbosum* (arándano) y se evaluó el porcentaje de germinación y emergencia, y el crecimiento de las plántulas obtenidas *in vitro* con diferentes concentraciones FeEDTA en los medios MS a un tercio de su

concentración y WP, con el propósito de obtener un cultivo *Vaccinium corymbosum* (arándano) con buena calidad de las plántulas, libre de contaminación y enfermedades, para lo cual se utilizarán luces LED de color rojo durante todo el proceso, este proyecto servirá de base para futuros trabajos de micropropagación de arándano.



OBJETIVOS

a. GENERAL

Evaluar tres tratamientos de manejo poscosecha de fruto (fermentación, etileno y temperatura baja a 4°C) y tratamiento de giberelinas en semillas (AG₃) para la germinación (porcentaje y tiempo) y crecimiento *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* (arándano) en dos medios de cultivo para el desarrollo de plántulas.

b. ESPECIFICOS

1. Evaluar el efecto de los tratamientos poscosecha de frutos (fermentación, etileno y temperatura baja a 4°C) de *Vaccinium corymbosum* (arándano) en el porcentaje de germinación y emergencia a través del tiempo, en medio de cultivo WP.
2. Evaluar el efecto del tratamiento de semillas (AG₃) de *Vaccinium corymbosum* (arándano) en el porcentaje de germinación y emergencia a través del tiempo, en medio de cultivo WP.
3. Determinar el efecto del tiempo y la concentración de Hipoclorito de sodio en la desinfestación de semillas de *Vaccinium corymbosum* (arándano) en la etapa de establecimiento *in vitro*.
4. Determinar el efecto de las concentraciones de FeEDTA en medio de cultivo MS y WP en el crecimiento de plántulas de *Vaccinium corymbosum* (arándano).

HIPOTESIS

Es posible que los distintos tratamientos en frutos (fermentación, etileno y temperatura baja a 4°C) y semillas (AG₃) influyan en el porcentaje germinación *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* (arándano) así como en su emergencia a través del tiempo y que la variación en la concentración de FeEDTA en los medios de cultivo MS 1/3 y WP tengan efecto en el crecimiento de las plántulas.



VARIABLES

TIPO DE VARIABLES			
INDEPENDIENTES		DEPENDIENTES	
VARIABLE	INDICADOR	VARIABLE	INDICADOR
Tratamiento de frutos	-Maduración ambiente		-Porcentaje y Tiempo de germinación
	-Con etileno		-Porcentaje de emergencia de cotiledones
	-Fermentación		
	-Refrigeración (4 °C)	Efecto de (4 tratamientos)	-Número de hojas verdaderas
Tratamiento de semillas con AG₃	-0 µM		-Número nudos
	-5 µM		
	-10 µM		-Longitud de tallos
	-15 µM		
	-20 µM		
Tratamiento de desinfestación	-Hipoclorito 1.25 % (15, 20 y 30 min.)	Contaminación	Porcentaje de contaminación
	-Hipoclorito 2.5 % (15, 20 y 30 min.)		
Variación en las concentraciones FeEDTA	- Medio de cultivo MS:		
	FeEDTA normal cc.		-Número de hojas
	FeEDTA cc.	Crecimiento de las plántulas	-Estado de hojas
	Duplicada		
	- Medio de cultivo WPM:		-Longitud de tallos
	FeEDTA cc normal		
	FeEDTA cc duplicada		

I. CAPITULO I: MARCO TEORICO

1.1 Arándano

a) Taxonomía del Arándano

El arándano (*Vaccinium corymbosum*), es un frutal menor nativo de Norteamérica, pertenece al reino Plantae, división Magnoliophyta, clase Magnoliopsida, orden Ericales, familia Ericaceae, subfamilia Vaccinioideae, tribu Vaccinieae, género *Vaccinium*, especie *Vaccinium corymbosum*⁷.

b) Características Botánicas

Vaccinium corymbosum (arándano) es un arbusto tetraploide perenne, rizomatoso y de polinización cruzada, es un cultivo comercialmente importante en todo el mundo. Posee un alto contenido de compuestos fenólicos antioxidantes, antocianinas, flavonoides y ácidos fenólicos, lo que le confiere grandes beneficios para la salud y posibles valores terapéuticos⁸.

Estos arbustos alcanzan alturas que van desde unos pocos centímetros hasta 2.5 metros, sus hojas son simples y caedizas, su forma varía de ovalada a lanceolada, se distribuyen en forma alterna a lo largo de la ramilla y varían entre uno a ocho centímetros en el largo, tienen color verde pálido y en otoño desarrollan una pigmentación rojiza.

Las estomas están ubicadas exclusivamente en el envés de las hojas en densidades de hasta 300 por mm cuadrado. La raíz es de aspecto fibroso y se distribuyen superficialmente, lo que las vuelve dependientes de una provisión constante de humedad. En condiciones naturales están asociadas con hongos micorrízicos específicos, con los cuales mantienen una relación de simbiosis. Las Flores se producen en racimos, generalmente axilares, las que se diferencian en las yemas terminales de las ramillas cuando se detiene el crecimiento vegetativo. La diferenciación, se manifiesta por un abultamiento notorio de yemas, las que se

recubren de escamas color café, fácilmente distinguibles de las yemas axilares vegetativas⁷.

El fruto es una baya redondeada, de 7 a 9 mm de diámetro, de color negro azulado, cubierta de pruina azul y con un ribete en lo alto a modo de coronita, su carne, de un agradable sabor agridulce, es de color vinoso, y en la parte central contiene diversas simientes. Las variedades que mejor se adaptan hasta el momento en nuestro país son Biloxi, Misty y Legacy⁹. El fruto puede poseer hasta 100 semillas pequeñas (1.5mm largo X 0.8mm de ancho) ubicadas al interior del endocarpio⁷.

c) Origen del Arándano:

El arándano es una baya originaria de América del Norte, donde crece en forma silvestre. Generalmente se cultivan dos tipos de arándano: Lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*) que comprende las especies más pequeñas y Highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*) que abarca los arbustos más grandes, dentro de los cuales se encuentran muchas variedades comerciales⁷.

d) Situación Arándano en nuestro país según Velázquez:

El Arándano es un producto nuevo para el Perú cuyos inicios radica en el 2008, actualmente es catalogado como el “Oro azul” de la tierra peruana. En 2016 señaló que el arándano en el Perú fue introducido en el 2012, año en el que se cultivaron 300 ha, a su vez indicó que Sierra Exportadora estableció huertos de arándano para hacer pruebas e incentivar su producción y exportación¹⁰.

e) Adaptación y Establecimiento del arbusto:

Comúnmente el arándano alto crece en turba húmeda o de acidez moderada a alta, en y alrededor de pantanos y lagos, a menudo con inundaciones prolongadas, así como en llanuras de inundación, laderas resguardadas y barrancos. Crece en sitios abiertos porque tiene cierta intolerancia a la sombra.

El arándano Highbush produce abundantes frutos cada año. Las abejas son el principal polinizador. Las semillas pueden estar ampliamente dispersas en excrementos de aves y mamíferos, pero el éxito de la germinación puede reducirse hasta un 15% después de pasar a través del intestino de un animal. En la parte sur de su área de distribución, las semillas de arándano alto tienen capas gruesas de semilla y requieren estratificación en frío antes de la germinación¹¹.

1.2 Germinación

Es la emergencia y desarrollo de las plántulas en una fase donde sus estructuras esenciales señalan si es capaz de desarrollarse en una planta satisfactoria bajo condiciones favorables del suelo. Mientras tanto las semillas pueden estar aletargadas durante largo tiempo dependiendo el tipo de especie que se trate, en algunas especies esta debe producirse en un periodo relativamente corto de tiempo o la semilla se pudre, en otros casos la germinación puede esperar cientos de años. En otras palabras, la germinación de la semilla es un fenómeno biológico, que puede interpretarse como la continuación del crecimiento del embrión, el cual ha sido temporalmente interrumpido durante la formación de la semilla¹².

Se pueden distinguir dos tipos de germinación: germinación epígea, si los cotiledones salen al exterior y fotosintetizan; y germinación hipógea, si los cotiledones quedan en el interior de la semilla cediendo sus reservas o pasándolas del endosperma al embrión¹² (figura 1.1).

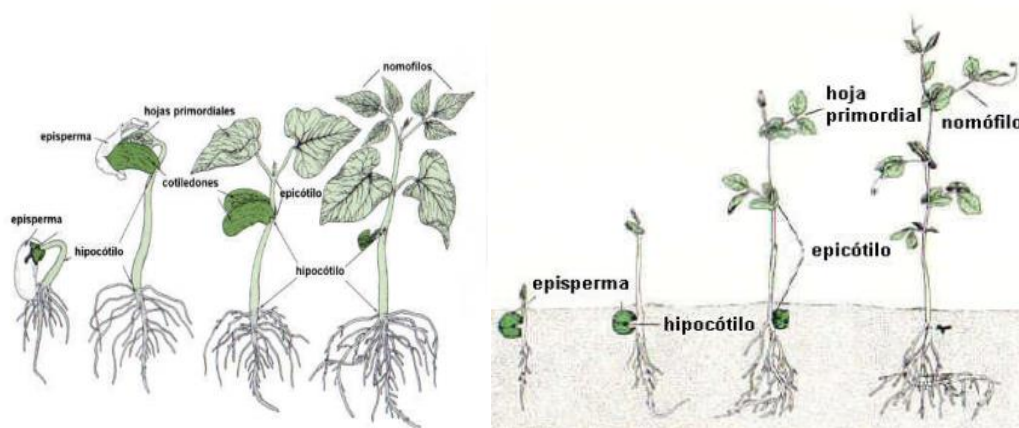


Figura 1.1. Tipos de germinación. Izquierda: germinación epigea. (Espinillo), derecha: germinación hipogea. (mato).¹³

1.2.1 Germinación del Arándano según Rocha

Las semillas de *Vaccinium* provienen de rudimentos seminales muy pequeños, por cada fruto se producen semillas variadas de tamaño, número, color y forma. Las semillas son muy pequeñas, menores de 2 mm de largo, muestran germinación del tipo epígea. En condiciones fisicoquímicas apropiadas, el proceso de germinación comienza con la emergencia de la radícula entre los 14 y 21 días de cultivo y las hojas de cotiledón se observan después de los 35 días¹⁴.

1.2.2 Fases del proceso típico de germinación de semillas según Pérez

a. Fase de hidratación:

En esta etapa se da una hidratación intensa por parte de los tejidos de la semilla, lo cual posibilita la activación de una serie de procesos metabólicos esenciales en la etapa de germinación. Va acompañado de un incremento proporcional de la actividad respiratoria¹⁵.

b. **Fase de germinación:**

Se da lugar a transformaciones metabólicas que preparan el camino para la fase de crecimiento. Se reduce en gran medida la absorción de agua por la semilla y se estabiliza el consumo de oxígeno¹⁵.

c. **Fase de crecimiento:**

Es la última etapa y se constituye con el inicio de cambios morfológicos visibles en la semilla, especialmente en la elongación de la radícula. La semilla que ha superado la fase de germinación y ha llegado a esta etapa puede seguir dos caminos o convertirse en una plántula o perder su viabilidad y morir. Una vez que la radícula ha roto las cubiertas seminales, se inicia el desarrollo de la plántula¹⁵.

En la figura 1.2 se puede observar el proceso de germinación de una semilla de *Vaccinium corymbosum* (arándano).

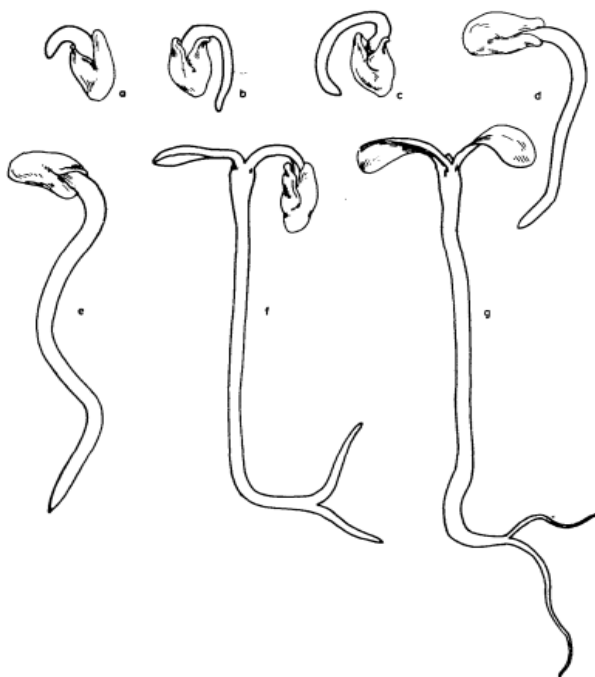


Figura 1.2. Germinación: a- dos días después de la emergencia de la radícula, b- 4 días, c- 6 días, d- 10 días, e- 15 días, liberación de la testa, g- 18 días, plántula con cotiledones libres y verdes (X15).¹⁴

1.2.3 Factores que afectan la germinación

La germinación de la semilla se compone de una secuencia de eventos físicos, bioquímicos y fisiológicos, influenciados por una variedad de factores, que pueden actuar aislados o combinados. Esos factores pueden ser extrínsecos, tales como: luz, temperatura y humedad; e intrínsecos, como: morfología, viabilidad y latencia¹⁶.

En lo que respecta a los factores extrínsecos, la germinación de las semillas de *Vaccinium* son afectadas por la temperatura y presentan un comportamiento fotoblástico positivo y ortodoxo, lo que significa que germina en presencia de luz, y es capaz de mantener la viabilidad incluso con bajo contenido de humedad¹⁶.

Dentro de los factores internos encontramos a la madurez de la semilla, decimos que una semilla es madura cuando ha alcanzado su completo desarrollo tanto desde el punto de vista morfológico como fisiológico. La madurez morfológica se consigue cuando las distintas estructuras de la semilla han completado su desarrollo, dándose por finalizada cuando el embrión ha alcanzado su máximo desarrollo. Aunque la semilla sea morfológicamente madura, muchas de ellas pueden seguir siendo incapaces de germinar porque necesitan experimentar aún una serie de transformaciones fisiológicas. Lo normal es que requieran la pérdida de sustancias inhibitoras de la germinación o la acumulación de sustancias promotoras.

Otro factor intrínseco es la viabilidad de las semillas, o período de tiempo durante el cual las semillas conservan su capacidad para germinar. Es un período variable y depende del tipo de semilla y de las condiciones de almacenamiento¹⁷.

1.3 Morfología de la semilla

La semilla es cada uno de los cuerpos que forman parte del fruto que da origen a una nueva planta, es la estructura mediante la que realizan la propagación las plantas que por ello se llaman espermatofitas (plantas con semilla). Las partes que conforman la

semilla son el embrión, el tejido de reserva (fuente de alimento) y el tegumento o testa (cubierta protectora)¹².

1.3.1 La testa

La cual puede tener muy distintas texturas y apariencias. Generalmente es dura y está formada por una capa interna y una externa de cutícula y, una o más capas de tejido grueso que sirve de protección. Estas características le confieren a la testa cierto grado de impermeabilidad al agua y a los gases. Ello le permite ejercer una influencia reguladora sobre el metabolismo y crecimiento de la semilla¹².

1.3.2 Endospermo

Llamado también albumen, su principal función es el almacenamiento de sustancias de reserva importantes en el proceso de germinación y las primeras fases de desarrollo de la planta¹².

1.3.3 Embrión

El embrión, del que puede desarrollarse una nueva plántula bajo condiciones apropiadas, está formado por los cotiledones (hojitas embrionarias), la plúmula (a partir de la cual se origina la parte aérea) y la radícula (que da origen a la raíz)¹².

Los cotiledones de la mayoría de las plantas dicotiledóneas son carnosos y contienen las sustancias de reserva de las semillas. En algunas dicotiledóneas, y en la mayoría de las monocotiledóneas, las sustancias de reserva están almacenadas en el endospermo y los cotiledones, que son delgados y muy delicados, funcionan como estructuras de absorción. Su papel fundamental es absorber el alimento ya digerido en el endosperma y transportarlo a las partes del embrión que están creciendo. Durante el proceso de germinación la primera estructura que emerge de la semilla, generalmente es la radícula. Esta raíz rápidamente penetra en el suelo y permite que la planta se ancle y comience a absorber agua y nutrientes. Luego emergen los cotiledones (germinación epigea) o quedan al ras del suelo (germinación hipogea). Con el paso del tiempo los

cotiledones disminuyen de tamaño, se van secando y finalmente se desprenden. Todas las sustancias almacenadas en ellos ya han sido utilizadas por la nueva plántula y por lo tanto sólo quedan restos de lo que eran. Para este momento ya han transcurrido varios días y a veces hasta semanas, y la plántula, que antes dependía de los cotiledones para obtener su alimento, ya es una planta capaz de obtener los nutrientes del suelo y la energía del Sol lo que necesita para crecer. Absorbe elementos del suelo y lleva a cabo la fotosíntesis activamente. En este momento ya se le considera una planta independiente y establecida¹².

El periodo de tiempo que transcurre entre el momento en que la semilla germina y en el que la plántula se establece como un organismo independiente constituye una de las fases decisivas y más delicadas en el ciclo de vida de la planta. Es el momento en que el individuo es más susceptible a diversos tipos de agresiones, como enfermedades por hongos, depredación por insectos, sequía, desenterramiento, etc. La mortandad en la etapa de plántula es enorme y sólo unos cuantos individuos llegan a establecerse, si no se toman los recaudos pertinentes¹².

En la actualidad se distinguen dos tipos de semillas¹⁸:

-Ortodoxas. Semillas que pueden secarse hasta un contenido de humedad (CH) bajo, de alrededor del 5 por ciento (peso en húmedo), y almacenarse perfectamente a temperaturas bajas o inferiores a 0°C durante largos períodos¹⁸.

Según bibliografía las Ericaceae, a las que pertenece el género *Vaccinium*, exhiben un comportamiento ortodoxo, ya que se ha observado tiempos de viabilidad de más de 20 años en 5 de las 28 especies de *Vaccinium*. Así también se ha determinado que las semillas de *V. arboreum* germinan después de un entierro de cuatro años en el suelo. Estos hallazgos indican un comportamiento ortodoxo de estas semillas¹⁹.

-Recalcitrantes. Semillas que no pueden sobrevivir si se las seca más allá de un contenido de humedad relativamente alto (con frecuencia en el intervalo de 20 y 50 por ciento, peso en húmedo) y que no toleran el almacenamiento durante largos períodos¹⁸.

1.4 Dormición y latencia de las semillas

Se denomina latencia a la incapacidad de una semilla para germinar, debido a que las condiciones ambientales no son las apropiadas para hacerlo, esta incapacidad va acompañada del mantenimiento de la viabilidad y mantiene su poder germinativo, el cual se manifestará cuando dichas condiciones ambientales sean propicias para la germinación²⁰.

La dormición de la semilla se define como la falla de una semilla viable intacta para completar la germinación en condiciones favorables y está controlada por varios factores ambientales como la luz y la temperatura. La inactividad y la germinación están determinadas por la acción conjunta del potencial de crecimiento del embrión y las restricciones impuestas por los tejidos que lo rodean. La influencia sustancial de los efectos ambientales en la expresión de las características de germinación y la participación de muchos genes hacen que la latencia sea un rasgo cuantitativo típico²¹.

Existen dos categorías de dormición de semillas: la dormición impuesta por las cubiertas seminales y la dormición embrionaria¹⁵.

1.4.1 Dormición impuesta por las cubiertas seminales

Los principales mecanismos son:

-La interferencia con la absorción de agua:

La presencia de cubiertas impermeables al agua es una de las causas más frecuentes de dormición de semillas. La presencia de cubiertas seminales impermeables al agua es una característica general¹⁵.

-Interferencia con el intercambio gaseoso:

La limitación del intercambio gaseoso con el exterior dada por las diferentes capas de tejidos que rodean al embrión, dificultando el ingreso de oxígeno. Este hecho dificulta la germinación de la semilla¹⁵.

-Presencia de inhibidores en las cubiertas seminales:

Sustancias bioquímicas de tipo hormonal presentes en la semilla que impiden el desarrollo de uno o varios pasos metabólicos imprescindibles para la germinación, sustancias que durante la posmaduración se irán transformando o eliminando²⁰. Las hormonas vegetales juegan un importante papel en el proceso de germinación de las semillas, el ácido abscísico (ABA) se encuentra dentro de las sustancias inhibidoras¹⁵.

-Ausencia de promotores de la germinación:

Sustancias bioquímicas de tipo hormonal que provocan la activación de enzimas imprescindibles para la germinación, como, por ejemplo, las enzimas digestivas, que están ausentes de la semilla. Estos promotores se irán formando y almacenando a lo largo de la posmaduración²⁰. Uno de los mayores promotores de la germinación es la hormona giberelina, la cual favorece el proceso de germinación¹⁵.

De la regulación de las fitohormonas incluidas el ácido giberélico (GA), el ácido abscísico (ABA), el etileno y la auxina, depende que la germinación sea exitosa. Entre ellos, se demuestra que ABA y GA son reguladores clave, que desempeñan papeles antagónicos en la germinación de las semillas²².

-Restricciones mecánicas:

En muchos casos las cubiertas seminales ejercen una verdadera restricción mecánica a la expansión de la radícula. La radícula no es capaz de romper las cubiertas y emerger al exterior¹⁵.

1.4.2 Dormición embrionaria

Sucede cuando el embrión viable y maduro no es capaz de germinar incluso si es colocado en condiciones favorables para la germinación. Esta se debe a la presencia de sustancias inhibidoras de la germinación en los propios tejidos del embrión. Dentro de los posibles inhibidores implicados en la dormición embrionaria está el ácido abscísico (ABA)¹⁵.

1.5 Madurez de la semilla

Las condiciones ambientales pueden afectar la cantidad y calidad de la semilla en desarrollo con respecto a los valores nutricionales o al contenido de ciertos elementos como aceites y grasas, el efecto de la temperatura es más controversial y afecta principalmente la tasa de crecimiento, pero también el contenido de aceites en algunas especies. Cuando la cama de germinación es rica en nutrientes no se producen efectos por el contenido de nutrientes en la semilla, cualquier condición que afecte la acumulación de reservas nutritivas en las semillas puede afectar el vigor en la siguiente generación de plantas. El estado de madurez de la semilla al momento de la recolección tiene un marcado efecto en su viabilidad. Además, se pueden mejorar las deficiencias en la madurez de las semillas mediante una manipulación y almacenamiento apropiados¹⁵.

1.6 Tratamientos pregerminativos más utilizados en semillas

Se aplican tratamientos a semillas para que su proceso de germinación se pueda dar de una manera más adecuada y rápida. Dentro de estos tratamientos pregerminativos

se encuentran el escarificado, estratificado, inmersión en agua caliente o a Temperatura ambiente, lixiviación con agua corriente, estimulantes químicos¹².

Dentro de los tratamientos pregerminativos habituales usados están:

- **La estratificación:**

La estratificación es utilizada para romper la latencia fisiológica, y consiste en colocar las semillas entre estratos que conservan la humedad, comúnmente arena o bien turba o vermiculita, en frío o calor. También podemos hablar de estratificación fría, en la cual se mantienen las semillas a temperaturas bajas (4 a 10 °C), de tal forma que se asemeje la temperatura de invierno, por un período que oscila entre 20 y 60 días, llegando inclusive hasta 120 días¹².

- **La escarificación:**

La escarificación es cualquier proceso que rompa, raye, altere mecánicamente o ablande las cubiertas de las semillas para hacerlas permeables al agua y a los gases. Se usa en especies cuya testa o cubierta seminal sea dura e impida la entrada de agua (latencia física). Este tratamiento puede ser mecánico o químico. Es mecánico si se raspa la cubierta de las semillas con lijas, limas o quebrarlas con un martillo o pinzas. Es química cuando se remoja las semillas por períodos breves (15 minutos) a 2 horas, en compuestos químicos como ácido sulfúrico concentrado¹².

- **La Lixiviación:**

Las semillas son remojadas en agua corriente con la finalidad de remover los inhibidores químicos presentes en la cubierta. Este tratamiento también es empleado con el objetivo de ablandar la testa. El tiempo de remojo puede ser de 12, 24, 48 y hasta 72 h, y en algunos casos, cambiándoles el agua con cierta frecuencia¹².

- **Hormonas y otros estimulantes químicos:**

Existen compuestos que estimulan la germinación, entre los más usados están: nitrato de potasio, tiourea, etileno, ácido giberélico (GA3), citokininas, entre otros. Todo este tipo de sustancias se emplean a diferentes concentraciones y tiempos de exposición, dependiendo de la especie de que se trate¹².

- **Flotación:**

Si bien no constituye un tratamiento pre-germinativo en sí, la separación de las semillas vanas de las semillas llenas es aconsejable como un primer paso. Para ello, la semilla se coloca en recipientes con agua durante, procurando no excederse en el número de semillas a colocar ya que de lo contrario las que flotan podrían impedir que caigan las que deberían hundirse. La semilla vana o vacía corresponde a la porción que queda flotando en superficie. Un ensayo de germinación con esta porción de semilla sobrenadante confirmó que el método es efectivo para la separación ya que solo se encontró 1 semilla viable en 700 de las posibles vanas vacías (Martínez, com. pers.). De esta manera, sólo se someten a tratamiento poscosecha aquellas que se hundieron que corresponden a las semillas llenas y por lo tanto, potencialmente viables, reduciéndose así los volúmenes a tratar posteriormente²³.

1.7 Micropropagación

Consiste en la propagación de plantas en un ambiente artificial controlado, empleando un medio de cultivo adecuado, tiene el potencial de producir 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; es decir 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 posea y al estímulo que reciban.

Dependiendo de las características de la planta que se pretenda propagar y del objetivo perseguido, la micropropagación puede realizarse a través de tres vías de regeneración: brotación de yemas adventicias preexistentes, producción de yemas de novo y embriogénesis somática¹⁷.

-Fase de establecimiento

Para plantas cultivadas a partir de semillas, la fase de establecimiento se define como la que comienza con la siembra de las semillas, pasando por la germinación, emergencia y desarrollo de las primeras hojas verdaderas²⁴.

1.8 Medios de cultivo

En la actualidad existen infinidad de formulaciones, cada una de las cuales contiene entre 15 y 30 compuestos químicos que suministran: carbono, nutrientes minerales, vitaminas, agente gelificante, sustancias reguladoras de crecimiento y otros compuestos. La composición mineral se define en forma precisa en cada uno de los medios y está dada tanto por los macroelementos (N, P, K, S, Mg y Ca) como por los microelementos (B, Mn, Zn, Cu, Ni, Co, Mo, Al, I y Fe). Los nutrientes deben estar en una concentración que permita el adecuado crecimiento celular²⁵.

Los requerimientos de nitrógeno son generalmente provistos por una mezcla de nitrato y amonio. El hierro es esencial para el crecimiento celular, por tanto, se aconseja la utilización del quelato Fe+EDTA que aumenta la solubilidad del hierro. Además, los medios de cultivo contienen fósforo, calcio, magnesio y azufre. Otro compuesto orgánico que promueve el crecimiento de algunos cultivos es el mio-inositol, el cual está involucrado en la síntesis de fosfolípidos y por lo tanto de sistemas de membranas. El papel de los aminoácidos en la nutrición de los tejidos y células vegetales es complejo, ya que los tejidos responden en forma diversa a su suplemento. En general, si los aminoácidos corresponden a la forma D son inhibidores, mientras que en la forma L tienen acción benéfica²⁵.

Si bien las plantas son autótrofas, puede ser necesario añadir al medio de cultivo algunas vitaminas hasta que los cultivos prosperen. Las vitaminas más comunes e importantes en el desarrollo de cultivos in vitro y que son añadida a la mayoría de los medios de cultivo son: tiamina (B1), piridoxina (B6) y ácido nicotínico. Otras vitaminas que suelen ser útiles son ácido pantoténico, biotina, riboflavina (B2), colina, cianocobalamina (B12) y ácido fólico. El ácido ascórbico (vitamina C) se considera benéfico en algunos casos, pero probablemente debido más a su capacidad reductora que a su papel como vitamina²⁵.

Aunque la composición del medio de Murashige-Skoog da buenos resultados en el cultivo in vitro de la mayoría de las especies, se debe seleccionar una combinación de nutriente en función del conocimiento de la fisiología de la especie, de los resultados experimentales obtenidos, del tipo de cultivo a desarrollar (plántulas, callos, raíces, meristemas, embriones) o del objetivo del trabajo (crecimiento, diferenciación u obtención de metabolitos)²⁵.

1.8.1 Reguladores de crecimiento

En algunos casos se obtienen cultivos in vitro con respuestas satisfactorias sin el uso de reguladores de crecimiento, pero en la mayoría de casos se hace necesario agregarlos al medio, generalmente del tipo auxinas o citocininas. Las auxinas más utilizadas son ANA; AIA y AIB; y las citocininas más empleadas son KIN, BAP y ZEA^{25, 26}.

a. Auxinas

Es una familia de sustancias químicas que tienen en común la capacidad de regular el crecimiento, la división celular y la diferenciación de raíces en los cultivos in vitro. En las plantas, las auxinas intervienen en el tropismo a la gravedad y a la luz, la dominancia apical, el crecimiento de las partes florales y la diferenciación de los tejidos vasculares. Las auxinas más utilizadas son el AIA (ácido indol-3-acético), el ANA (ácido α -naftalenacético), el 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), el AIB (ácido indolbutírico), el pCPA (ácido p-

clorofenoxiacético) y el BTOA (ácido benzotiazol-2-oxiacético). En cuanto al mecanismo de acción de las auxinas, se conoce que ellas aumentan la plasticidad de la pared celular, lo que permite la expansión de la célula. La elongación inducida por auxinas se inicia al unirse esta hormona al receptor, probablemente localizado en la cara externa de la membrana plasmática, lo que desencadena una cascada de eventos que determinan la secreción de protones por la célula. Como resultado de esta acidificación, se activan proteínas que rompen los enlaces cruzados entre las moléculas de celulosa y permiten la elongación cuando aumenta la presión de turgencia²⁶.

b. **Citocininas**

Son derivados de la adenina que promueven la división celular. Entre ellas cabe mencionar las siguientes: BA (bencil adenina), K (cinetina o 6-furfuril aminopurina), Zea (zeatina) y 2-iP (N-isopentenil adenina). Las dos primeras son citocininas sintéticas y las dos últimas naturales. Las citocininas in vivo incrementan la tasa de división celular, el transporte de solutos hacia las hojas, semillas, flores y frutos y producen un retardo de la senescencia de las hojas²⁶.

c. **Giberelinas (GAs)**

Constituyen una familia de compuestos químicos tetracíclicos diterpenoides que regulan varios procesos del crecimiento y desarrollo como la germinación de semillas, la elongación de tallos, el desarrollo de raíces y la floración. Las GAs se sintetizan a partir de ácido mevalónico en tallos jóvenes y en semillas en desarrollo. Permiten superar la latencia de semillas y brotes, promueven la floración y retardan la senescencia²⁶.

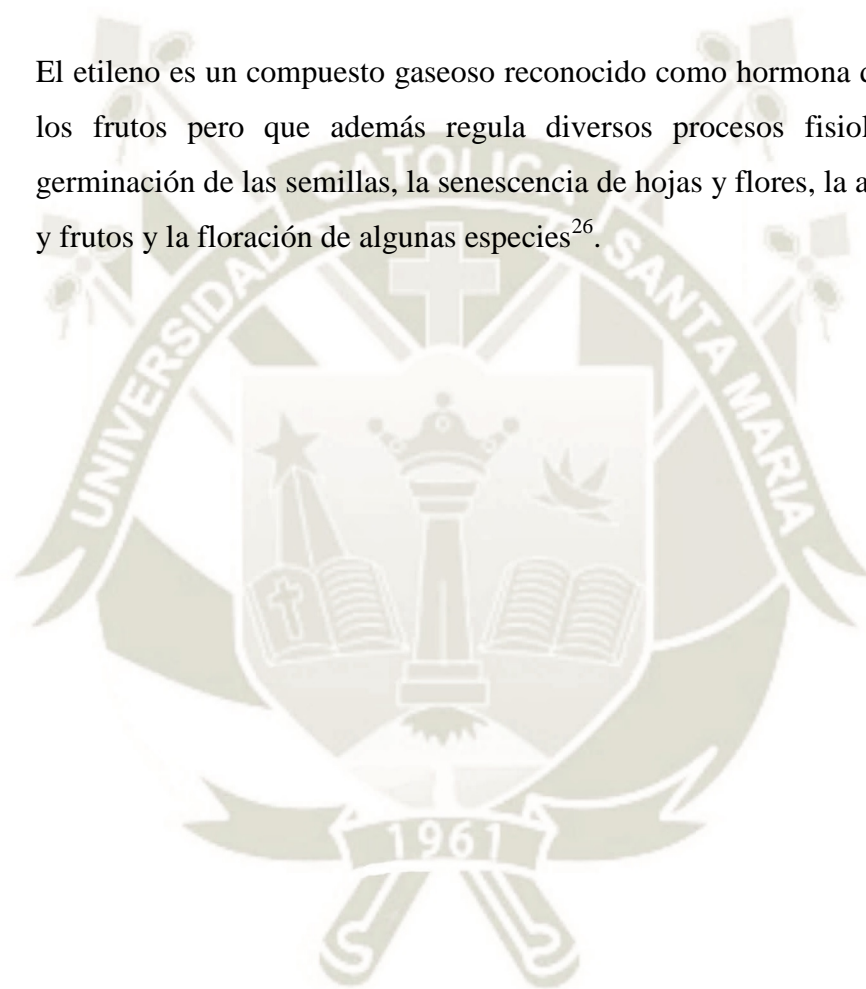
d. **El ácido abscísico (ABA)**

Es un regulador de crecimiento cuya tasa de biosíntesis se modifica significativamente frente al estrés fisiológico ocasionado por falta de agua, salinidad del suelo, bajas o altas temperaturas, etc. El ABA provoca respuestas

que ayudan a proteger a las plantas contra estos factores, como el cierre de estomas y la producción de proteínas protectoras. También participa en la embriogénesis normal y en la formación de proteínas de almacenamiento en semillas²⁶.

e. **Etileno**

El etileno es un compuesto gaseoso reconocido como hormona de maduración de los frutos pero que además regula diversos procesos fisiológicos como la germinación de las semillas, la senescencia de hojas y flores, la abscisión de hojas y frutos y la floración de algunas especies²⁶.



II. CAPITULO II: MATERIALES Y METODOS

2.1 Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el pabellón de H, laboratorio 302 de la facultad de ciencias farmacéuticas, bioquímicas y biotecnológicas, escuela profesional de Ingeniería Biotecnológica.

2.2 Materiales

Muestras y/o Unidades Biológicas

Semillas obtenidas del fruto de la especie vegetal *Vaccinium corymbosum* (arándano) de la ciudad de Arequipa.

Material de Laboratorio

- Beakers
- Pipetas
- Baguetas
- Fiolas 100, 500 y 1000 mL
- Probeta 500 mL
- Mecheros de alcohol
- Espátula
- Picetas
- Gorros
- Mascarillas
- Guantes

Insumos y Reactivos Químicos

- Medio de cultivo WP y Medio MS preparado en laboratorio
- Agar DM 180 DIPROQUIM

- Modificadores de pH
- Etanol de 96%
- Hipoclorito de Sodio CLOROX

Equipos e Instrumentación.

- Balanza analítica ABJ-NM/ABS-N KERN
- Bisturís
- Pinzas
- Cinta de pH
- Cámara de flujo laminar Horizontal H. W. Kessel S.A.
- Autoclave vertical HL-340 CLSA Kossodo
- Pipetas

Otros

- Bolsas de Polipropileno y Polietileno
- Papel Aluminio
- Plastic Wrap
- Envases de plástico y vidrio
- Gasa

2.3 Métodos

La metodología seguida para la presente tesis se dividió en cinco pasos generales:

- A. La preparación de soluciones stock tanto para el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog 1962), como para el medio WP (Woody Plant 1981)
- B. Los tratamientos aplicados:
 - ✓ Sobre los frutos de *Vaccinium corymbosum* (arándano)
 - Preparación de medio de Cultivo WP
 - Aplicación de tratamientos a frutos
 - Obtención de semillas

✓ Sobre las semillas de *Vaccinium corymbosum* (arándano)

- Preparación de medio de Cultivo WP
- Aplicación de tratamientos a semillas
- Obtención de semillas

C. Las pruebas de desinfestación de semillas en la etapa de establecimiento *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* (arándano)

D. El establecimiento *in vitro* de las semillas de *Vaccinium corymbosum* (arándano)

E. La variación de la concentración de FeEDTA en los medios de cultivo MS y WP sobre el crecimiento *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* (arándano)

Durante los pasos de establecimiento y cultivo *in vitro* se realizaron evaluaciones semanales. A continuación, se detallan los pasos mencionados anteriormente.

A. Preparación de soluciones stock para medio de cultivo MS (Murashige y Skoog 1962) y WPM (Woody Plant 1981)

Se prepararon soluciones stock de cada una de las sales requeridas, tanto macronutrientes como micronutrientes, así como de vitaminas y reguladores de crecimiento, para lo cual se pesaron los nutrientes, disolvieron y aforaron las distintas soluciones a 100 mL. y una vez bien disueltas se traspasaron a frascos y fueron puestos en refrigeración.

En el caso de los macronutrientes correspondientes al medio MS se prepararon a 1/3 de su concentración normal. Estas soluciones fueron mantenidas en frascos de vidrio color ámbar para evitar alguna reacción desfavorable por acción de la luz, y conservadas en refrigeración a 4 °C. En el caso de las hormonas estas se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

Las soluciones que se prepararon para la elaboración de los medios de cultivo, se detallan en el Anexo N° 1.

B. Tratamientos aplicados:

Se aplicaron diferentes tratamientos divididos en dos grupos, el primer grupo fueron tratamientos aplicados al fruto y el segundo grupo tratamientos aplicados a la semilla.

Para el primer grupo, se seleccionaron tratamientos que ayuden con la maduración del fruto de manera que se puedan obtener las semillas más maduras posibles y así evitar la presencia de inhibidores de la germinación, así como un tratamiento con temperatura fría a 4°C para evaluar la acumulación de horas frío en el proceso de germinación.

Para el segundo grupo se aplicó diferentes concentraciones hormonales de AG₃ conocido como un promotor en el proceso de germinación²⁶, para evaluar cuál de estas concentraciones es la más adecuada en la germinación *in vitro*.

Todos los tratamientos se realizaron por triplicado y las semillas sembradas fueron escogidas al azar del grupo de semillas seleccionadas como viables.

✓ **Tratamientos aplicados sobre los frutos de *Vaccinium corymbosum* (arándano)**

Aplicación de tratamientos a frutos:

Los frutos de Arándano fueron lavados con abundante agua para evitar proliferación de microorganismos y secados lo mejor posible con papel toalla. Una vez secos, se procedió al pesado de 200 gramos de frutos para cada tratamiento.

Los tratamientos aplicados al fruto fueron cuatro, tres de ellos consisten en hacer madurar los frutos de diferentes maneras para así obtener semillas dispuestas para la germinación y el cuarto aplicación de temperatura fría, como se observa en la tabla 2.1.

Tabla 2.1. Tratamientos aplicados al fruto de *Vaccinium corymbosum* (arándano)

Tratamientos	
Tratamiento Control (T1)	Maduración al ambiente
Tratamiento 2 (T2)	Maduración con ayuda de etileno
Tratamiento 3 (T3)	Fermentación
Tratamiento 4 (T4)	Refrigeración a 4 °C

Para el Tratamiento uno los frutos se dejaron madurar al ambiente de 7 a 10 días dependiendo su estado actual de madurez (control), en un lugar limpio a temperatura ambiente.

Para el Tratamiento dos los frutos maduraron con ayuda de etileno proveniente de plátanos maduros que fueron colocados a su costado dentro de una bolsa de plástico. Según literatura los plátanos presentan entre 6 y 40 ppm de Etileno cuando están en su etapa de madurez²⁹, basado en esta referencia nos aseguramos la presencia de etileno.

El etileno desprendido por los plátanos se queda en la atmosfera dentro de bolsa negra, y se evaluó el efecto del mismo durante la fase de germinación.

Para el Tratamiento tres los frutos se colocaron dentro de un envase de vidrio, algunos de los frutos fueron apretados levemente, se tapó herméticamente el envase y se conservó en un lugar cálido y sin luz por 4-6 días; en donde se llevó a cabo el proceso de fermentación de los frutos. Terminado el proceso se midió los grados Brix del fruto (ver Anexo 2) para confirmar su estado de madurez, ya que durante la maduración del fruto hay un incremento en la actividad enzimática, produciéndose hidrolisis del almidón, al darse el proceso de degradación se generan azúcares solubles, incrementando así el contenido de SST en el fruto, para arándanos se reportan entre 10.6 y 13.2 °Brix al momento de la cosecha y un rango aceptable en su estado de madurez más alto entre 12 y 15 °Brix³⁰.

Para el Tratamiento cuatro (T4) se llevó a cabo refrigeración por 3 semanas a 4 °C. Una vez aplicados los tratamientos pregerminativos se procedió a extraer las semillas.

En la figura 2.1 se muestra la metodología respectiva para los tratamientos aplicados al fruto de (*Vaccinium corymbosum*) arándano.



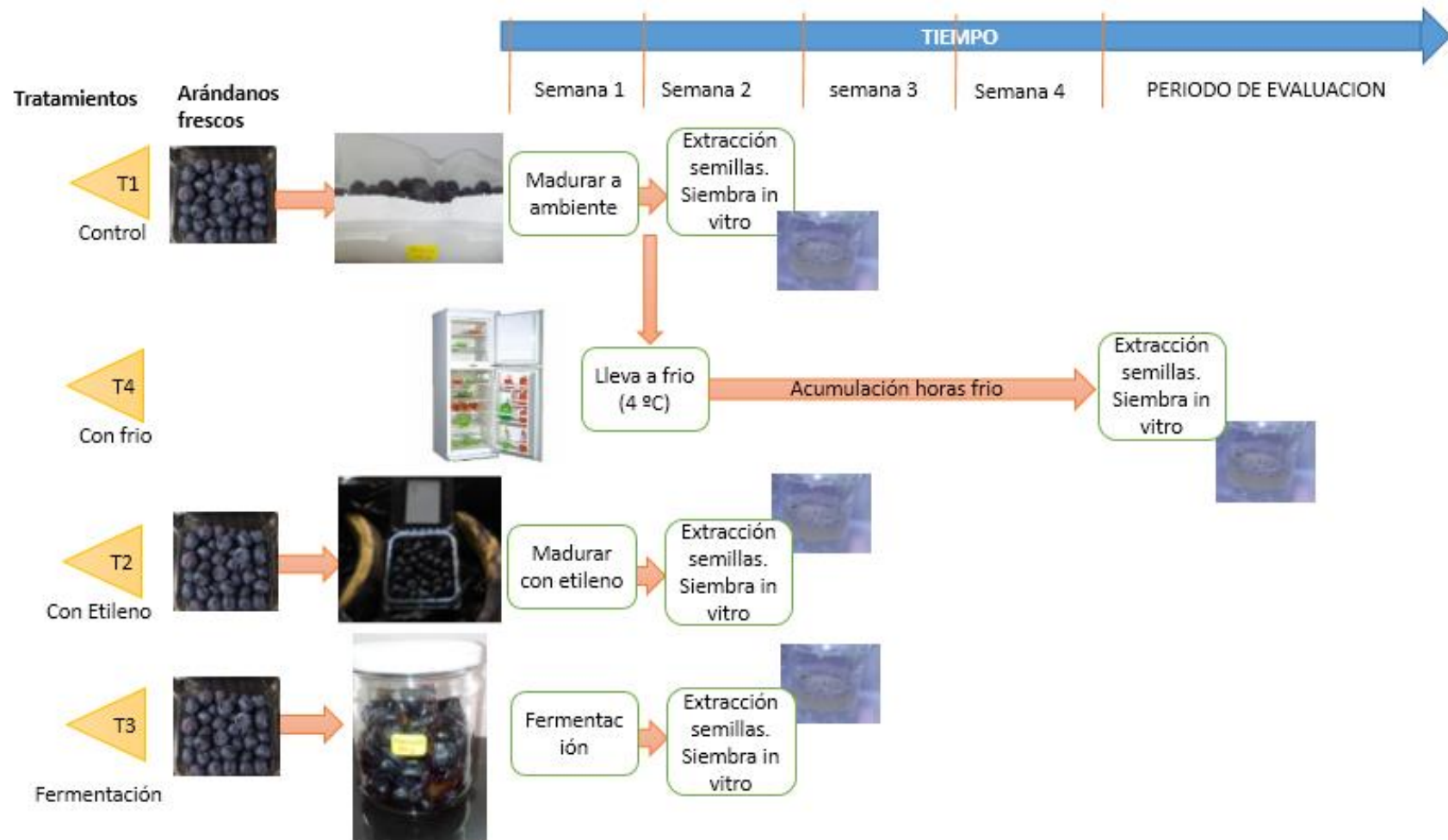


Figura 2.1. Tratamientos aplicados al fruto de *Vaccinium corymbosum* (Arándano).

Obtención de semillas:

El material que se utilizó en este proyecto son semillas de arándano obtenidas a partir de frutos comprados en el mercado San Camilo (figura 2.2). Las semillas fueron extraídas de los frutos luego de los distintos tratamientos de maduración y temperatura en frío, los cuales se detallaron previamente.

De todas las semillas extraídas se seleccionaron las semillas con apariencia madura, es decir con coloración rojiza y rojiza intensa (figura 2.3), luego se seleccionaron con la prueba de flotación (figura 2.4), las semillas flotantes fueron desechadas y se conservaron todas las que se fueron al fondo del agua. Se dejaron secar en sombra para posteriormente ser utilizadas. Luego, fueron desinfectadas y sembradas en cultivo *in vitro* en medio WP.



Figura 2.2. Arándanos frescos, obtenidos del mercado San Camilo

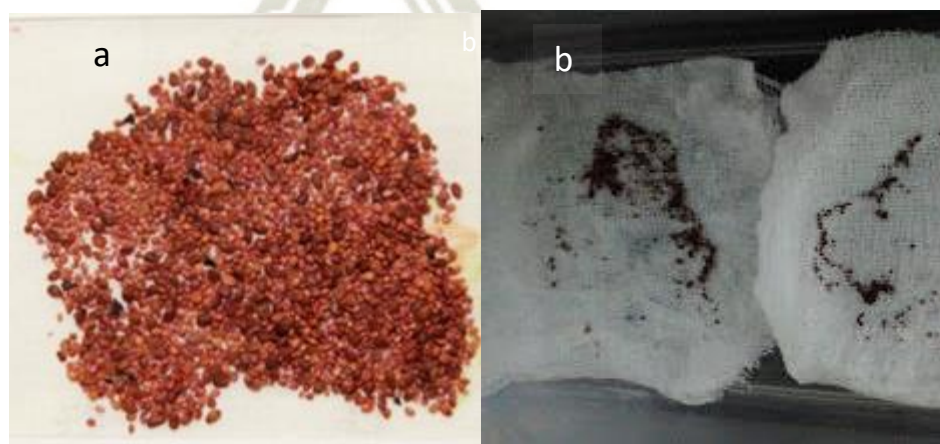


Figura 2.3. Semillas obtenidas. a) semillas sin selección b) semillas seleccionadas por coloración

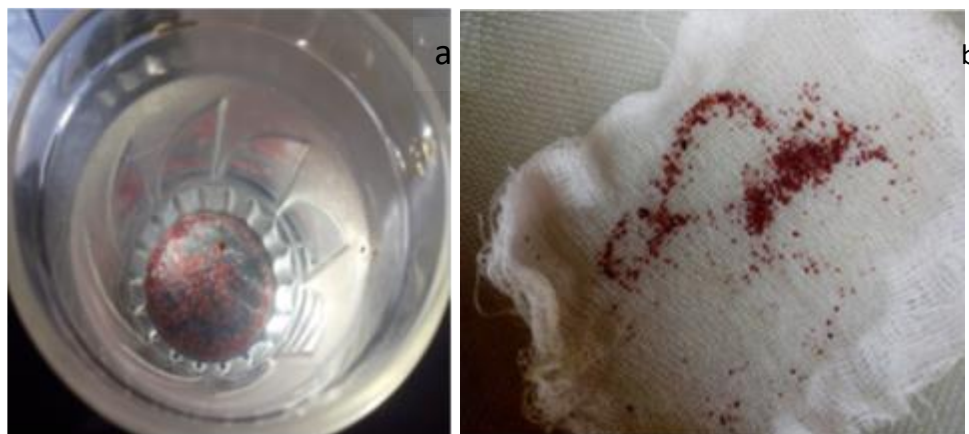


Figura 2.4. Semillas obtenidas por flotación. a) Prueba de flotación b) semillas viables seleccionadas

Preparación de medio de Cultivo WP:

Para el proceso de establecimiento *in vitro* de las semillas de Arándano, se preparó medio de cultivo base para especies leñosas (WP), para lo cual se agregaron las cantidades correspondientes tanto de macronutrientes, micronutrientes y vitaminas como se observa en el anexo 1, luego fue autoclavado junto con los envases durante 15 minutos a 15 libras de presión y 121 °C de temperatura.

El medio de cultivo fue suplementado con 3% de sacarosa. 0.8 % de agar y ajustado a pH 5.2, con HCl 1N, o NaOH 1N (Mejía, 1994).

Posteriormente el medio fue vertido a cada envase dentro de cámara para prevenir contaminación, se dejó enfriar y gelificar.

✓ **Tratamientos aplicados sobre las semillas de *Vaccinium corymbosum* (arándano)**

Aplicación de tratamientos a semillas:

Los tratamientos aplicados a las semillas fueron diferentes concentraciones de ácido Giberélico AG₃, como se observa en la tabla 2.2.

Tabla 2.2. Tratamientos aplicados a la semilla de *Vaccinium corymbosum* (arándano)

	Tratamientos
Tratamiento Control (T _{s1})	0 μM AG ₃
Tratamiento 2 (T _{s2})	5 μM AG ₃
Tratamiento 3 (T _{s3})	10 μM AG ₃
Tratamiento 4 (T _{s4})	15 μM AG ₃
Tratamiento 5 (T _{s5})	20 μM AG ₃

La solución hormonal de AG₃ fue dispuesta en el medio de cultivo WPM durante su proceso de preparación, luego fue esterilizado y dispuesto en los envases, se esperó que enfriara y gelificara. El procedimiento se muestra en la figura 2.5.

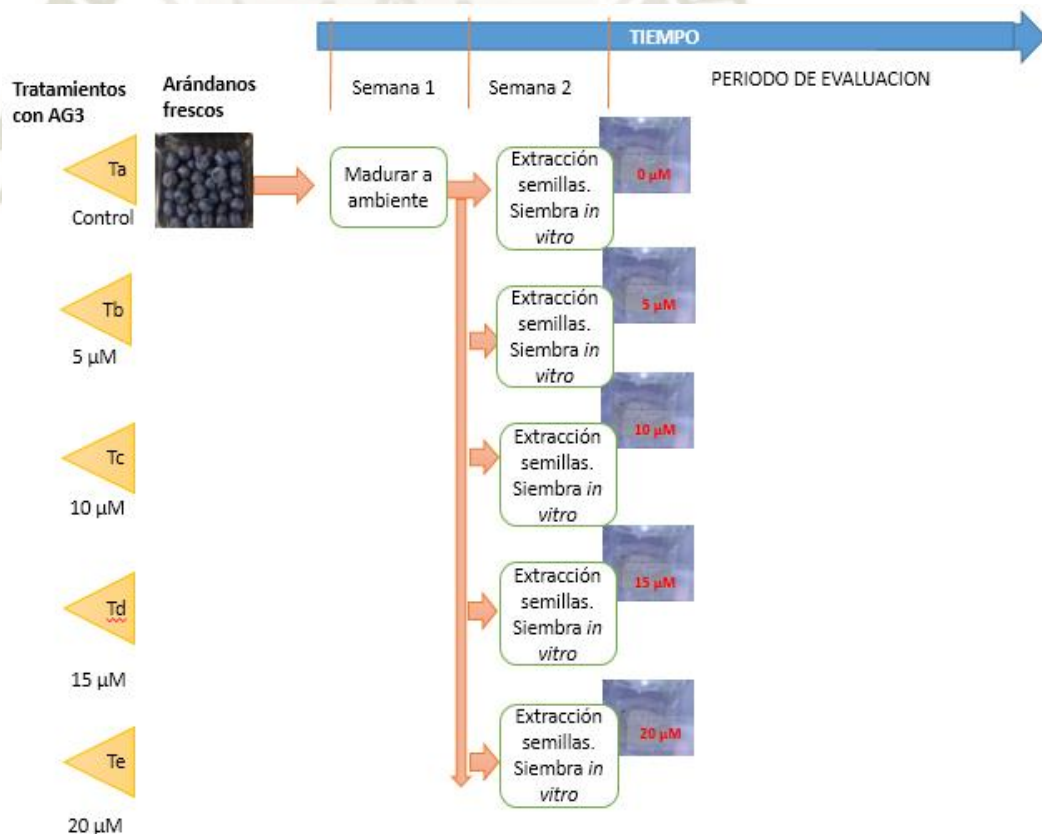


Figura 2.5. Tratamientos de AG₃ aplicados a la semilla de *Vaccinium corymbosum* (Arándano) (T₅).

Obtención de semillas:

El material utilizado fueron semillas de arándano extraídas de frutos comprados en el mercado San Camilo. Las semillas utilizadas fueron aquellas que maduraron a temperatura ambiente (control) sin ningún tipo de tratamiento previo. De todas las semillas extraídas se seleccionaron las semillas con apariencia madura, es decir con coloración rojiza y rojiza intensa, luego se seleccionaron con la prueba de flotación, las semillas flotantes fueron desechadas y se conservaron todas las que se fueron al fondo del agua. Finalmente se dejaron secar en sombra para posteriormente ser utilizadas.

Luego fueron desinfestadas y sembradas en cultivo *in vitro* en medio WP que contenía diferentes concentraciones de AG₃ en su composición.

Preparación de medio de Cultivo WPM:

El medio de cultivo utilizado fue preparado de la misma manera que en los tratamientos aplicados a frutos, como se detalló en tratamientos aplicados a frutos

C. Pruebas de desinfestación en la etapa de establecimiento *in vitro*

Se evaluó dos concentraciones de Hipoclorito de sodio (NaClO) con tres tiempos cada uno, como se observa en la tabla 2.3, y el procedimiento se siguió como se ve en la figura 2.6.

Tabla 2.3. Tratamientos de desinfestación aplicados a semillas en etapa de establecimiento *in vitro*

Tratamientos	Tiempo (minutos)		
	20	25	30
Tratamiento A NaClO 1.25 %	x	x	x
Tratamiento B NaClO 2.5 %	x	x	x

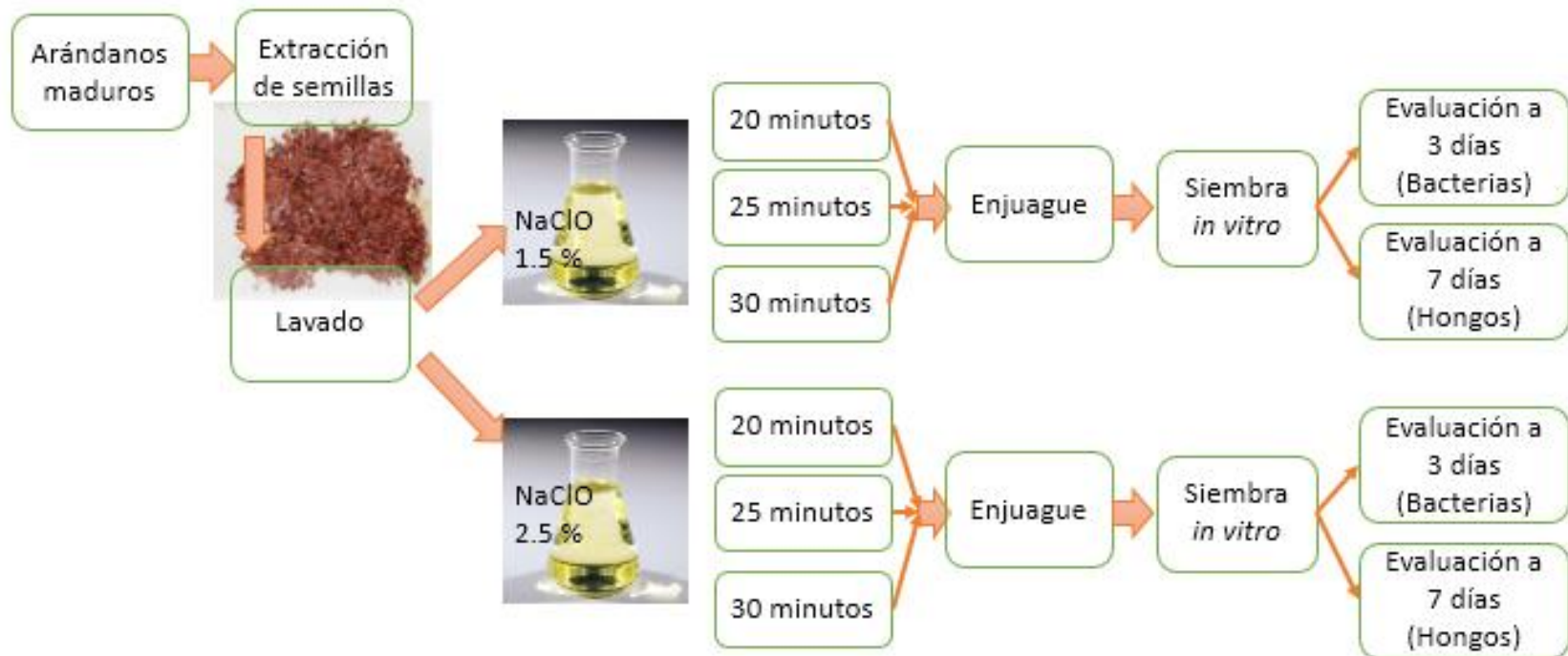


Figura 2.6. Proceso de desinfección de semillas de *Vaccinium corymbosum* (arándano)

Se determinó cual es la concentración de NaClO más adecuada para obtener un cultivo *in vitro* sin contaminación durante este proyecto, para lo cual se prepararon 6 tubos Falcón de 50 ml. conteniendo las diferentes concentraciones de NaClO y los tubos fueron debidamente rotulados.

Para ayudar al proceso de desinfestación de las semillas, estas fueron colocadas en bolsas de gasa estéril (preparadas por el investigador) para ayudar en el proceso de desinfestación como se observa en la figura 2.7. Luego las bolsitas conteniendo las semillas fueron enjuagadas con agua destilada más tween 20 por 20 minutos en agitación constante.

Una vez transcurrido este tiempo, se colocó cada bolsita en el tubo Falcon correspondiente, pasado el tiempo establecido para cada proceso de desinfestación se procedió a enjuagarlas por triplicado o hasta observar la eliminación del NaClO, esto proceso se realizó con agua destilada estéril en cámara de flujo laminar (figura 2.8).

Con la ayuda de una pinza y una tijera estéril se aperturó la bolsa contenedora de semillas y un total de 10 semillas fueron colocadas en placas de cultivo con medio WP sin hormonas, la evaluación de contaminación se evaluó a los 3 días para la observación de presencia bacteriana y 7 días para la evaluación de hongos.



Figura 2.7. Semillas en bolsas de gasa esteril listas para desinfestación.



Figura 2.8. Material listo para desinfección y siembra dentro de cámara de flujo laminar.

D. Establecimiento *in vitro* de las semillas

Una vez obtenidos los resultados del método de desinfección (NaClO 2.5 % por 20 minutos) a utilizar, se replicó para el posterior establecimiento y cultivo *in vitro* de las semillas de *Vaccinium corymbosum* (arándano). En la figura 2.9, se muestra las semillas desinfectadas listas para su establecimiento *in vitro* en cámara de flujo laminar.



Figura 2.9. Semillas desinfectadas listas para siembra en medio WP.

Se utilizaron envases de plástico con 20 mililitros de medio de cultivo WP a pH 5.2. Con la ayuda de una pinza estéril se procedió a la siembra de aproximadamente 45 semillas por envase, previamente desinfectadas. Cada semilla se colocó de manera superficial, ligeramente hundidas en el medio de cultivo.

Luego se cultivaron a temperatura ambiente aproximadamente 21°C a 22°C con fotoperiodo de 16 horas luz, con luz roja. Los envases fueron colocados dentro de bolsas de polietileno para prevenir contaminación, con un pedazo de algodón mojado para mantener el contenido de humedad en el ambiente.

Se llevó a cabo la evaluación tanto del porcentaje de germinación, como del porcentaje de emergencia de cada semilla durante aproximadamente 3 meses, tiempo que conllevó el proceso de germinación de las semillas en los diferentes tratamientos pregerminativos. Evaluando así, el número de hojas verdaderas, y número de nudos presentes en cada plántula emergida. Es importante recalcar que las plántulas fueron trasplantadas a envases nuevo al cabo de dos meses para asegurar que no haya pérdida de nutrientes.

E. Evaluaciones de los medios de cultivo MS y WP sobre el crecimiento *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* (arándano)

A las 18 semanas de realizadas las evaluaciones sobre la germinación y emergencia de las semillas. Las plántulas de *Vaccinium corymbosum* obtenidas del mejor tratamiento fueron utilizadas para evaluar los medios de cultivo MS y WP sobre el crecimiento *in vitro* de las mismas.

Las plántulas obtenidas fueron trasplantadas a otros envases de vidrio con 20 ml de medio de cultivo suplementado con 0.1 μ M ANA y 2 μ M BAP a pH 5.2 para evaluar así su crecimiento. Para lo cual se prepararon dos medios de cultivo.

Para determinar cuál es el medio de cultivo más adecuado y debido a que la presencia de FeEDTA es importante en el crecimiento de las plántulas, se evaluaron los medios MS 1/3 ya que este medio se asemeja más a las concentraciones del WP y según bibliografía se reporta su utilización, y WP con

dos concentraciones de FeEDTA en su composición, como se muestra en la siguiente tabla 2.4.

Para esta evaluación se preparó nueva solución stock del quelato FeEDTA debido a que esta solución es fotosensible y rápidamente puede estropearse.

Tabla 2.4. Concentración de los componentes FeEDTA en los medios MS y WP.

	MS 1/3		WP	
	Concentración	Concentración	Concentración	Concentración
	x1	X2	x1	X2
Na ₂ EDTA (mg/L)	37.3	55.6	37.3	55.6
FeSO ₄ (mg/L)	27.8	74.6	27.8	74.6

Cada medio de cultivo fue suplementado con 3% de sacarosa, 0.8 % de agar y ajustado a pH 5.2, con HCl 1N, o NaOH 1N (Mejía, 1994).

III. CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSION

Dentro de todos los tratamientos de frutos y semillas se pudo apreciar la aparición de la radícula al inicio del proceso de germinación, instante desde el cual se consideró el inicio de dicho proceso en el presente experimento. Se realizó el seguimiento semanal tanto de porcentaje de germinación, emergencia, aparición de hojas verdaderas, número de nudos y tamaño de tallos.

En la figura 3.1 se puede apreciar una de las semillas (representativa) germinadas de 4 semanas, con presencia de cotiledones perteneciente al T3 de tratamientos aplicados al fruto.

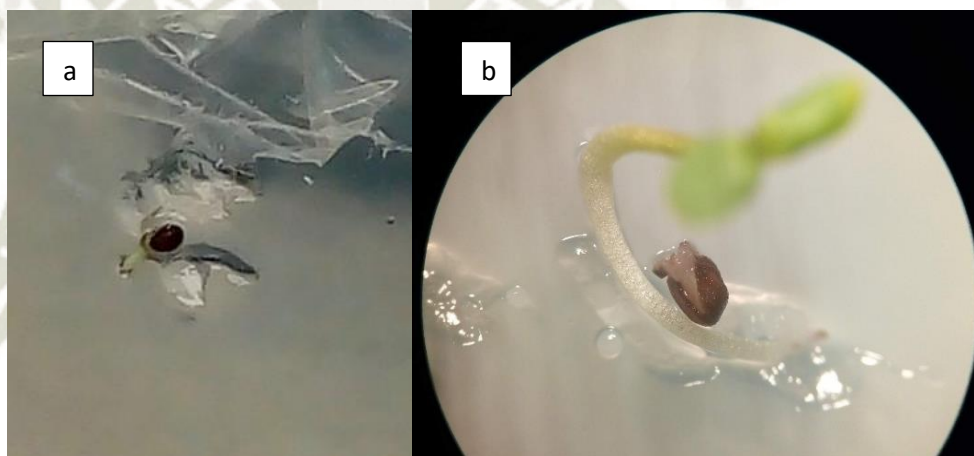


Figura 3.1. Germinación Arándano tratamiento 3 aplicado al fruto: a: emergencia de la radícula (22 días); b: plántula de Arándano con cotiledones (40 días)

3.1 Porcentaje y tiempo de germinación de los tratamientos aplicados a fruto de *Vaccinium corymbosum* (Arándano)

De todos los tratamientos aplicados a frutos, con respecto al porcentaje y tiempo de germinación: el tratamiento 3, es el que presentó mejores resultados, seguido del tratamiento 4, mientras los tratamientos 1 y 2 tuvieron un porcentaje de germinación bajo. En las siguientes figuras (3.2, 3.3, 3.4) se puede apreciar cómo se llevó a cabo el proceso de germinación en las primeras semanas en diferentes tratamientos aplicados.

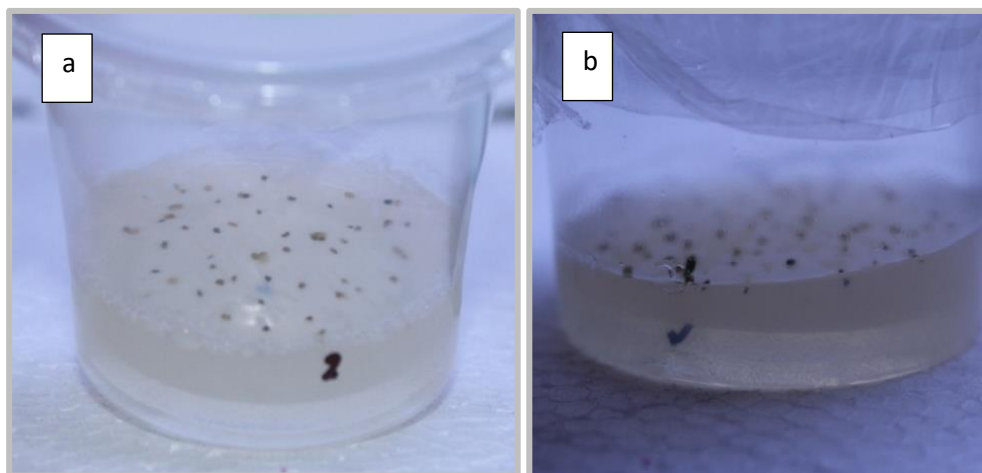


Figura 3.2. Germinación de los tratamientos aplicados al fruto (T1 y T2) (Control y etileno) a la quinta semana. a: tratamiento 1 (no se observa germinación), b: tratamiento 2 (se observa germinación)

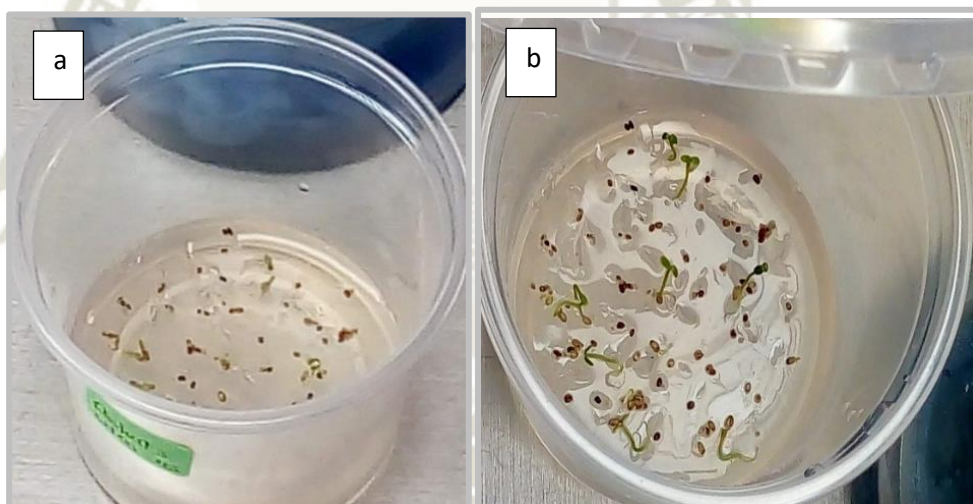


Figura 3.3. Germinación del Tratamiento 3 aplicado al fruto (fermentación). a: presencia de semillas germinadas (quinta semana) b: presencia de cotiledones (décima semana)

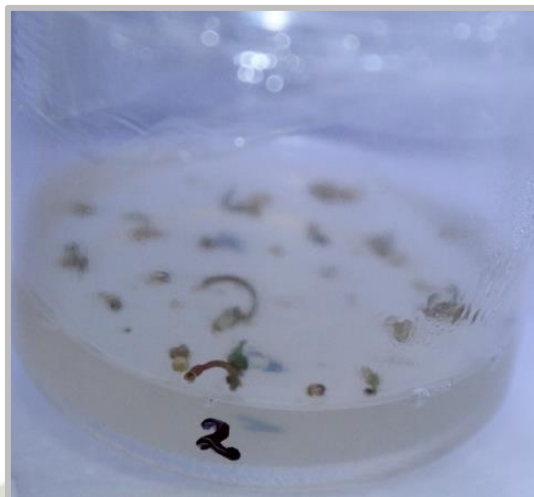


Figura 3.4. Germinación tratamiento 4 aplicado al fruto (con frío) a la quinta semana.

En la tabla 3.1 se muestran los datos obtenidos en cuanto a germinación a partir de la cuarta semana de siembra ya que en esta semana se evidenciaron las primeras semillas en proceso de germinación pertenecientes al T3 (fermentación). El mayor porcentaje de germinación alcanzado fue de 50 % a las 18 semanas de evaluación. Los resultados con tres repeticiones por tratamientos al fruto se observan en anexo 3.

Tabla 3.1. Número y Porcentaje de semillas de *Vaccinium corymbosum* (Arándano) germinadas, con 3 repeticiones por tratamiento aplicados a frutos. (T1: maduración del fruto al ambiente), T2: maduración del fruto con etileno, T3: maduración del fruto en fermentación y T4: frutos tratados con frío) hasta la semana 18

Tratamientos	Número y porcentaje	EVALUACION (Semanas)														
		4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
T1	\bar{x}	0.0	0.0	0.3	0.7	3.3	3.7	3.7	4.7	6.0	6.0	6.3	6.7	7.0	7.0	7.0
	%	0.0	0.0	0.8	1.7	8.3	9.2	9.2	11.7	15.0	15.0	15.8	16.7	17.5	17.5	17.5
T2	\bar{x}	0	0.3	0.3	0.3	0.3	1.3	1.7	2.3	4.3	4.7	7	7	7	7	7
	%	0	0.8	0.8	0.8	0.8	3.3	4.2	5.8	10.8	11.7	17.5	17.5	17.5	17.5	17.5
T3	\bar{x}	7.7	9.7	11.7	13.7	14.7	15.7	15.7	17.7	17.7	18.7	18.7	19.7	20	20	20
	%	19.2	24.2	29.2	34.2	36.7	39.2	39.2	44.2	44.2	46.7	46.7	49.2	50	50	50
T4	\bar{x}	6.33	7.33	8	9.33	11.3	12	13	14.7	14.7	14.7	15	15	15	15	16
	%	15.8	18.3	20	23.3	28.3	30	32.5	36.7	36.7	36.7	37.5	37.5	37.5	37.5	40

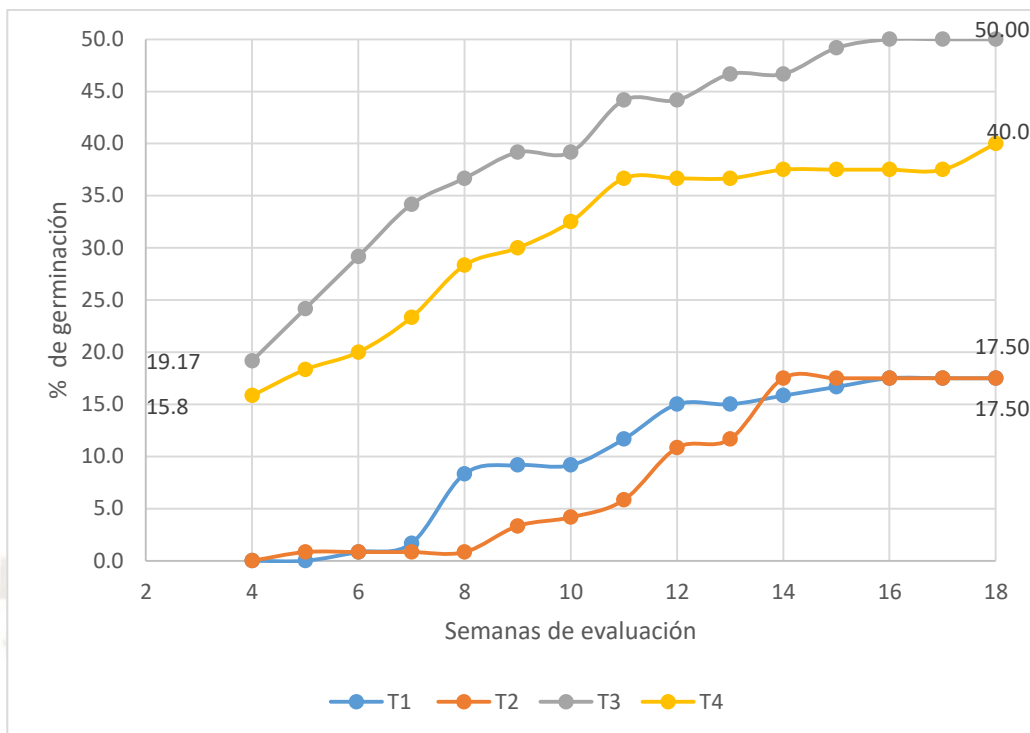


Figura 3.5. Porcentaje de germinación de tratamientos aplicados a frutos de *Vaccinium corymbosum* (Arándano) (T1: maduración del fruto al ambiente), T2: maduración del fruto con etileno, T3: maduración del fruto en fermentación y T4: frutos tratados con frío), hasta la semana 18

En la figura 3.5 se puede apreciar que a la cuarta semana de siembra ya existe un porcentaje de germinación para los tratamientos 3 y 4 aplicados a los frutos (19.17 % y 15.08 % respectivamente), cuyo proceso de germinación fue ascendente entre la semana 4 y 15 y se detuvo en la semana 16 para el T3 y semana 18 para el T4. Mientras que para los tratamientos T1 y T2 el proceso de germinación a la cuarta semana es nulo, y dicho proceso recién comienza a manifestarse entre la quinta y sexta semana, siendo 0.8 % para T1 en la sexta semana y 0.8 % para el T2 en la quinta semana, luego el proceso de germinación fue ascendente entre la semana 7 y la 14 deteniéndose aproximadamente en la semana 15.

Los resultados nos demuestran que el tratamiento con mejor porcentaje germinación fue el tratamiento 3 (fermentación) con un total de 50% de germinación a las 18 semanas de evaluación, seguido del tratamiento 4 con un 40 % y los tratamientos 1 y 2 presentaron los porcentajes más bajos de germinación

con 17.5 %. Así mismo, se pudo observar que tanto el tratamiento 3 como 4 cuentan con un porcentaje mayor de germinación al inicio de su evaluación, acortando el periodo de germinación del Arándano.

La evaluación se llevó a cabo por 18 semanas, luego de las cuales no se observó proceso de germinación para ningún tratamiento.

En la figura 3.6 se observa algunas plántulas germinadas en los tratamientos aplicados a frutos (T1, T2, T3 y T4).

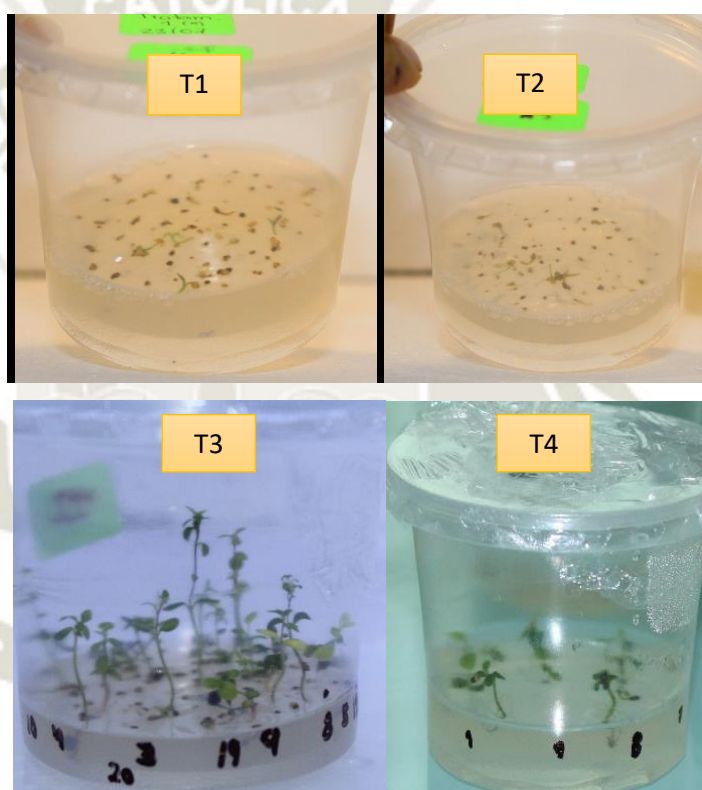


Figura 3.6. Plántulas de *Vaccinium corymbosum* (Arándano) obtenidas a los tres meses de siembra de semillas en medio de cultivo WP, pertenecientes a tratamientos aplicados al fruto.

Los tratamientos aplicados al fruto están basados en la capacidad de cada uno de ellos de madurar al fruto y a su vez a la semilla, para que de esta manera las enzimas inhibitoras que poseen las semillas sean contrarrestadas y el proceso de germinación pueda darse de forma rápida y efectiva².

Según Baskin y Anderson²⁰ en condiciones naturales, los procesos de germinación de las semillas y el desarrollo de las plántulas del género *Vaccinium* se ven obstaculizados por varios factores, generando largos procesos de germinación y bajo número de plántulas.

Respecto al porcentaje de germinación reportado para *Vaccinium* en un tiempo de germinación de 3 meses, encontramos que Azevedo y Neves dos santos⁸ obtuvieron un porcentaje de germinación del 40 % en cultivo *in vitro* de semillas de *Vaccinium ashei*. Así mismo, Jimenez y abdernour³¹ obtuvieron un porcentaje máximo de germinación de 7.7 % *in vitro* para *Vaccinium consanguineum* reportando este porcentaje como menor al obtenido en siembra convencional (*ex vitro*) la cual fue de 24 %. Como se puede analizar, los porcentajes de germinación varían entre especies de *Vaccinium*, además los porcentajes de germinación se encuentran aproximadamente en 40 %, estos resultados nos muestran un bajo porcentaje de germinación para el género *Vaccinium*. Pero, por otro lado tenemos a Torres y Trujillo³², quienes germinaron semillas de *Vaccinium Floribundum* obteniendo un porcentaje de germinación de 60 % con tratamiento de semillas al frío 4°C, también Castro, Olarte y Pacheco² reportaron un máximo de 65 % de germinación en semillas de *Vacciniun meridionale* provenientes de frutos maduros con un proceso de germinación que duró 105 días, lo que corrobora la importancia de la madurez del fruto sobre el proceso de germinación. Estos resultados nos sugieren que la aplicación de algún tipo de tratamiento pregerminativo o las condiciones de los frutos influye en el proceso de germinación, pero también es importante volver a recalcar que las especies son totalmente diferentes a las anteriores mencionadas. En este trabajo el mayor porcentaje de germinación obtenido fue 50 % correspondiente a fermentación (T3) y el tiempo máximo de germinación fue de 126 días equivalentes a cuatro meses y medio, estos resultados se encuentran dentro del rango de resultados reportados y además concuerda con obtener el mayor porcentaje de germinación como lo reportado en la literatura².

Basado en Eck y Hartmann, no existe ninguna necesidad de tratamientos previos para la germinación de arándanos, pero Shahram encontró que, si las semillas eran

sometidas a procesos de enfriamiento por tres meses, su proceso de germinación mejoraba. Así mismo, Thaur y Rathore²¹ sugirieron la estratificación de semillas de arándano a 3 °C por el periodo de un mes. Por literatura se sabe que los frutales de hoja caduca requieren acumulación de frío invernal para romper el receso y luego de calor, para el desarrollo y correcta maduración de la fruta²⁷, también que la estratificación en frío actúa como un promotor de la germinación, la cual se puede deber a adaptaciones al ambiente natural, en los cuales, se originó la especie²⁸.

En nuestros resultados se puede ver (tabla 3.1) que el proceso de enfriamiento por tres semanas (T4) arrojó resultados de germinación de 40 % constituyéndose como el segundo tratamiento con mejor éxito de los tratamientos aplicados al fruto, pero sin embargo, teniendo en cuenta los antecedentes³², se consideraría como un porcentaje de germinación ligeramente bajo, esto podría deberse a que los resultados encontrados en literatura son referidos a otras especies de *Vaccinium*, otras variedades y en otras condiciones ambientales de trabajo.

De manera general, la propagación de arándanos por semillas no es muy utilizado debido a la germinación errática y al largo periodo que toma, por lo que es utilizada principalmente en programas de mejoramiento genético³¹.

En el presente trabajo, se destaca que se pueden utilizar tratamientos pregerminativos en arándano aplicados al fruto y así obtener mayores porcentajes de germinación que los habituales en condiciones *ex vitro* (24 %).

Además, reportamos un porcentaje de semillas no germinadas, siendo 82.5 % para T1 y T2, 50 % para T3 y 60 % para T4.

Con los resultados obtenidos en maduración al ambiente (T1) se demuestra que el porcentaje de germinación del arándano es baja en condiciones *in vitro* sin ningún tratamiento.

La presencia de semillas no germinadas podría deberse a múltiples factores, tales como: la presencia de una testa dura, o por encontrarse aun en periodo de latencia, entre otros. La latencia de las semillas se puede clasificar en: latencia fisiológica,

morfológica, física y combinada (física y fisiológica). La impermeabilidad de la cubierta de la semilla es una latencia física, que impide la entrada de agua y puede ser causada por la presencia de sustancias como la suberina, lignina, cutina, taninos, pectinas, así como derivados de quinina. Los estudios químicos indican que la cutícula y las cadenas de pigmento, presentes en el revestimiento de la semilla, están compuestas por materiales poliméricos insolubles⁸, durante el proceso de maduración del fruto, si este está en un estado de madurez alto, las sustancias inhibidoras van desapareciendo y se hacen más presentes las sustancias promotoras de la germinación, dando mayor libertad al proceso de germinación; es por eso que se menciona la estrecha relación entre la madurez del fruto y la madurez fisiológica de la semilla².

3.2 Porcentaje y tiempo de germinación de los tratamientos aplicados a semillas de *Vaccinium corymbosum* (Arándano)

Se aplicaron varias concentraciones de ácido giberélico AG₃ al medio de cultivo WP donde se sembraron las semillas, y luego de 18 semanas de su siembra, los resultados demostraron que el mejor tratamiento fue de 5 µM de AG₃ con un porcentaje de germinación de 55% a las 18 semanas como se observa en la tabla 3.2. Los resultados con repeticiones se muestran en el anexo 4.

En la figura 3.7 se muestran los resultados de germinación a los tres meses, correspondientes a los tratamientos aplicados a semillas.

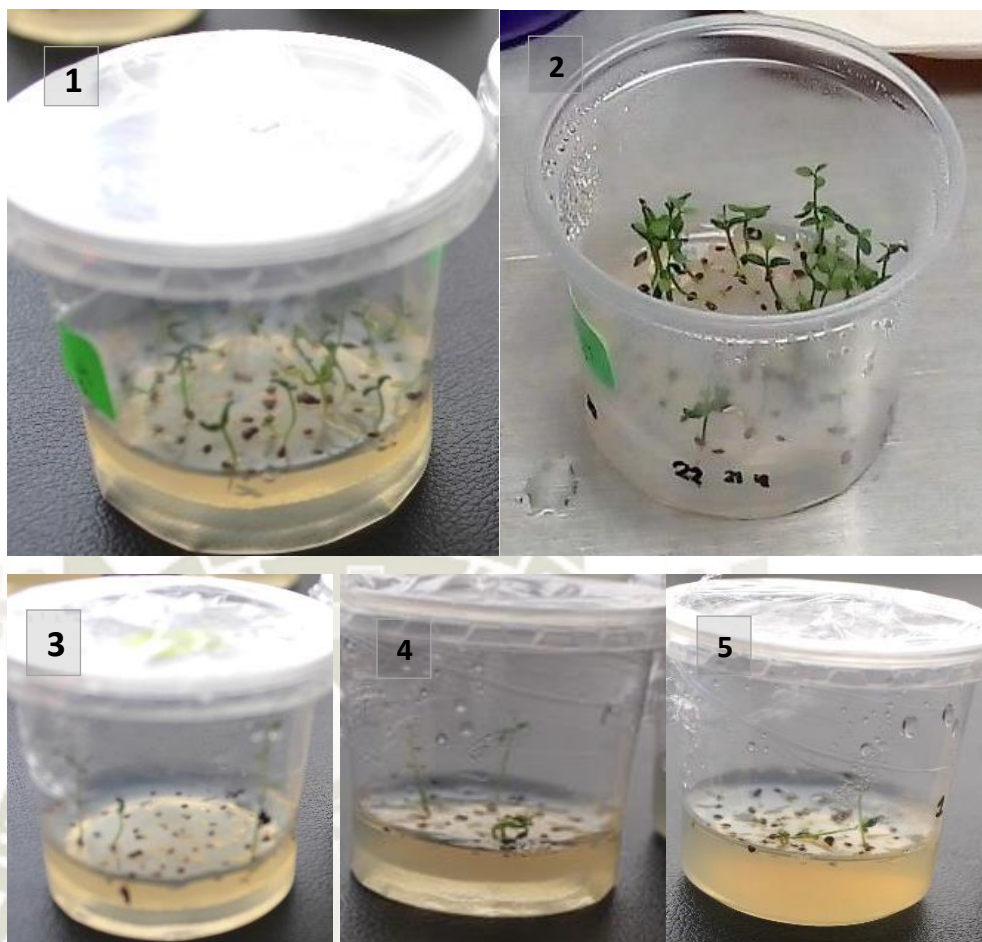


Figura 3.7. Plántulas de *Vaccinium corymbosum* (Arándano) obtenidas mediante germinación in vitro a los tres meses de siembra. Tratamientos a semillas con AG_3 , 1= $0\mu M$, 2= $5\mu M$, 3= $10\mu M$, 4= $15\mu M$, 5= $20\mu M$.

Tabla 3.2. Número y Porcentaje de germinación de semillas de *Vaccinium corymbosum* (Arándano), con 3 repeticiones por tratamiento aplicado a semillas. (T_s1: control, T_s2: semillas con 5 µM AG₃, T_s3: semillas con 10 µM AG₃, T_s4: semillas con 15 µM AG₃ y T_s5: semillas con 20 µM AG₃) hasta la semana 18.

Tratamientos	Número y porcentaje	EVALUACION (Semanas)															
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
T_s1	\bar{x}	0	0	1.0	1.0	1.3	3.3	3.7	3.7	5.3	6.0	6.0	6.7	7.3	7.3	7.3	7.3
	%	0	0	2.5	2.5	3.3	8.3	9.2	9.2	13.3	15.0	15.0	16.7	18.3	18.3	18.3	18.3
T_s2	\bar{x}	2.3	2.3	2.3	4.3	6.7	8.3	10.0	13.3	15.3	16.0	17.7	20	20	22	22	22
	%	5.8	5.8	5.8	10.8	16.7	20.8	25.0	33.3	38.3	40.0	44.2	50	50	55	55	55
T_s3	\bar{x}	0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.7	1.3	1.3	1.7	2.0	2.3	3.0	3.7	4	4	4
	%	0	0.0	0.0	0.0	0.8	1.7	3.3	3.3	4.2	5.0	5.8	7.5	9.2	10	10	10
T_s4	\bar{x}	0	0	0	0	0	1.0	1.3	1.7	2.0	2.3	2.3	3.7	4.3	4.3	4.3	4.3
	%	0	0	0	0	0	2.5	3.3	4.2	5.0	5.8	5.8	9.2	10.8	10.8	10.8	10.8
T_s5	\bar{x}	0	0	0	0	0.3	1.3	1.7	2	2	3	3.7	3.7	4	4	4	4
	%	0	0	0	0	0.8	3.3	4.2	5.0	5.0	7.5	9.2	9.2	10	10	10	10

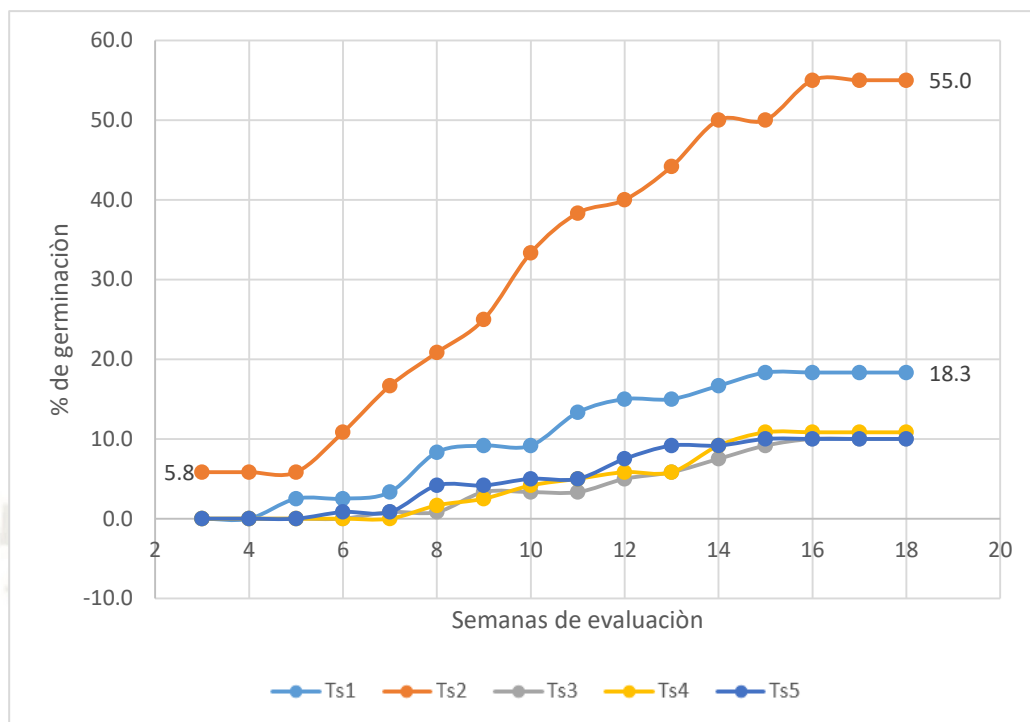


Figura 3.8. Porcentaje de germinación de tratamientos aplicados a semillas de *Vaccinium corymbosum* (Arándano). (T_s1: control, T_s2: semillas con 5 μM AG₃, T_s3: semillas con 10 μM AG₃, T_s4: semillas con 15 μM AG₃ y T_s5: semillas con 20 μM AG₃) hasta la semana 18

En la figura 3.8 se puede apreciar la curva de crecimiento respecto al porcentaje de germinación obtenido desde la tercera semana hasta la semana 18 después de su siembra. A la tercera semana de siembra ya existe un porcentaje de germinación para T_s2 con 5.8 %, cuyo proceso de germinación fue ascendente entre la semana 5 y 16 y se detuvo en esta última. Mientras que para los tratamientos “T_s1, T_s3, T_s4 y T_s5” el proceso de germinación a la cuarta semana fue nulo. T_s1 inició el proceso en la quinta semana y fue desarrollándose hasta la semana 14, para los tratamientos “T_s3, T_s4 y T_s5” el proceso empezó aproximadamente en la semana 7 y se desarrolló hasta la semana 14 de manera muy baja.

Todo el proceso de evaluación del porcentaje de germinación se llevó a cabo hasta la semana 18, no mostrando ningún cambio desde la semana 16.

Los resultados nos demuestran (tabla 3.2) que el tratamiento con mejor porcentaje germinación fue 5 μM AG_3 (T_{s2}) con un total de 55 % de germinación a las 18 semanas de evaluación, seguido del tratamiento control con un 18.3 %; mientras los 10 μM (T_{s3}), 15 μM (T_{s4}) y 20 μM (T_{s5}) presentaron los porcentajes más bajos de germinación con 10 %, 10.8 % y 10 % respectivamente.

Estos resultados nos indica que a mayor concentración de AG_3 no necesariamente se obtendrá mayor porcentaje de germinación, sino que existe un limite en el aumento de concentración. También se evidenciaron casos de elongación de los tallos en las concentraciones más altas de AG_3 (10-20 μM) debido a que la alta concentración de AG_3 estimuló un mayor crecimiento.

El ácido giberélico (AG_3) se utiliza como promotor o inductor de la germinación en semillas de una gran variedad de plantas, pero no en todas funciona de la misma manera. Según Dweikat and Lyrene³³, la germinación puede ser inducida por el ácido Giberélico, lo cual se confirmó con los resultados de esta investigación, pero sin embargo también se afirma que dependiendo de las especies a mayor concentración de AG_3 el porcentaje de germinación será mayor, lo que se contrapone a los resultados obtenidos en este proyecto ya que a mayor concentración de AG_3 no necesariamente habrá mayor porcentaje de germinación, hasta 5 μM AG_3 el porcentaje de germinación aumenta, pero a mayores concentraciones el porcentaje de germinación no se incrementa.

Jimenez³¹ reportó un porcentaje de germinación de 7.7 % con 3 mg/L AG_3 (8.66 μM) y de 0 % sin aplicación de AG_3 para *Vaccinium consanguineum*. Así mismo, Magnitskiy y Ligarreto³⁴ reportaron que la germinación de semillas de *Vaccinium* fue lento con un porcentaje de germinación máximo de 29 % sin AG_3 y 31 % con 200 mg/L de AG_3 en frutos de *Vaccinium meridionale* Swartz.

En el presente trabajo el mayor porcentaje de germinación obtenido fue de 55% con una concentración de 5 μM AG_3 (1.73 mg/L), siendo este resultado mucho mayor que el de los reportados anteriormente en condiciones de germinación normales con o sin AG_3 , esta diferencia podría deberse a que los trabajos

reportados sumergieron las semillas en la solución con AG₃ por 24 horas y en nuestro caso la hormona fue agregada al medio de cultivo. Sin embargo, Buitrago y Balaguera³⁰ reportaron un porcentaje de germinación de 66 % con semillas *Vaccinium myrtillus* obtenidas de frutos muy maduros y pretratadas con Ácido Giberélico (200mg/L lo que equivale a 577 μ M) por 24 horas. Este resultado fue mayor al nuestro y esto podría deberse al tipo de especie de *Vaccinium* estudiada ya que se conoce por literatura que los resultados varían por especies y variedades³³.

Resultados estadísticos sobre germinación

Prueba de MANOVA

Para conocer si existen diferencias significativas en los promedios y porcentaje de semillas germinadas dependiendo de los tratamientos que recibió, se realizó un análisis de MANOVA (tabla 3.3) tomando como variable dependiente el promedio y porcentaje de semillas germinadas y como variables independientes el tipo de tratamiento que recibió cuando fue aplicado al fruto (T1, T2, T3 y T4) y a la semilla (T_s1, T_s2, T_s3, T_s4 y T_s5). Los datos estadísticos descriptivos obtenidos para los tratamientos aplicados se muestran en el Anexo 17.

Tabla 3.3. Pruebas Multivariantes para tratamientos de Germinación de semilla y fruto

		Pruebas multivariantes				
Tratamientos aplicados		Valor	F	Gl de hipótesis	gl de error	Sig.
Germinación	Traza de Pillai	.919	15.860	6.000	112.000	.000
	Lambda de Wilks	.205	22.90b	6.000	110.000	.000
Germinación	Traza de Pillai	.723	9.898	8.000	140.000	.000
	Lambda de Wilks	.347	12.028b	8.000	138.000	.000

a. Diseño: Intersección + Germinación. b. Estadístico exacto. c. El estadístico es un límite superior en F que genera un límite inferior en el nivel de significación.

Elaboración: propia.

Para el caso de tratamientos aplicados al fruto, tomando de referencia el Lambda de Wilks, el valor para el modelo global fue de $F = 22.190$ con un valor de Significancia $= .000$ lo que indica que se rechaza la hipótesis nula, es decir que hay diferencias significativas entre los distintos tratamientos aplicados al fruto.

Para el caso de tratamientos aplicados a la semilla, tomando de referencia la Traza de Pillai, el valor para el modelo fue de $F = 9.898$ con un valor de Significancia $= .000$ lo que indica que se rechaza la hipótesis nula, es decir que hay diferencias significativas entre los distintos tratamientos aplicados al fruto.

Los resultados de comparaciones múltiples: para el caso del promedio de semillas germinadas por el tratamiento aplicado al fruto, la comparación entre el T1 y T2, resulta no significativa, lo que indica que no hay diferencia entre estos tratamientos. La comparación del T1 contra el T3 y T4, si resulta significativa, es decir que existen diferencias entre estos tratamientos. La comparación de T3 contra el resto de tratamiento resulta significativa en todos los casos lo que quiere decir que el T3 es diferente de todos los tratamientos. Así mismo la comparación del T4 contra todos los tratamientos resulta significativa, es decir que T4 es diferente de todos los tratamientos.

Para el caso del tratamiento a semilla, la comparación entre el tratamiento $0AG_3$ contra los Tratamientos $5AG_3$ y $10AG_3$ son significativamente diferentes. La comparación entre $5AG_3$ y todos los tratamientos se hallan significativamente diferentes. Para más detalle ver Anexo 17, tabla 5.

Mediante la aplicación del test de Tukey, se confirmó que el tratamiento 3 (Fermentación) es el que genera más semillas germinadas.

En la figura 3.9 se aprecian los promedios de cada tratamiento aplicado al fruto, donde claramente destaca el tratamiento 3.

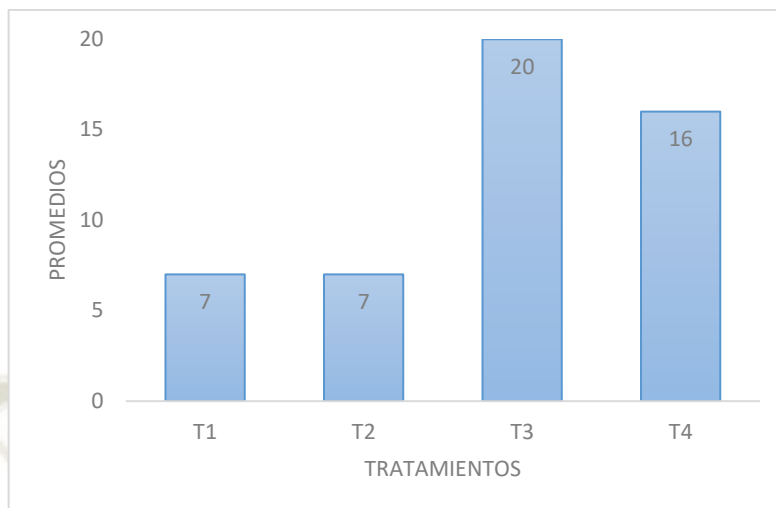


Figura 3.9. Promedio de semillas germinadas para tratamientos aplicados a frutos. Elaboración propia.

Mediante la aplicación del test de Tukey, se confirmó que el tratamiento 5AG₃ es el que genera más semillas germinadas.

En la figura 3.10 se aprecian los promedios de cada tratamiento aplicado a la semilla, donde claramente destaca el tratamiento 2 (5μM AG₃).

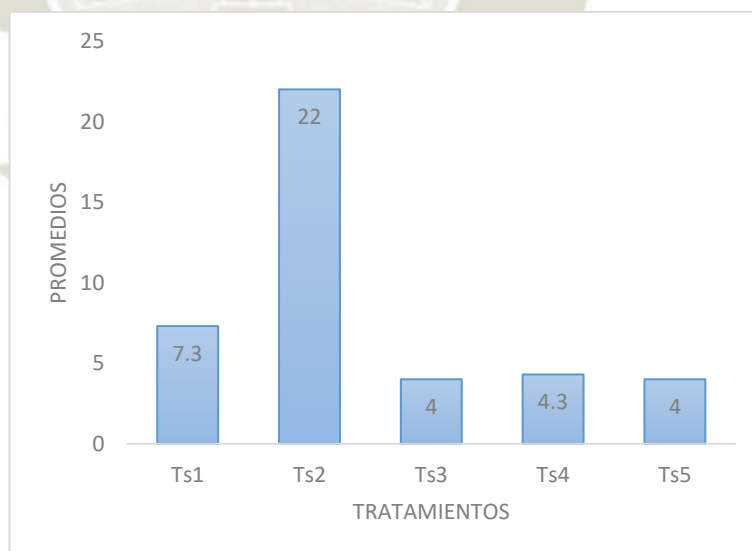


Figura 3.10. Promedio de semillas germinadas para tratamientos aplicados a semillas. Elaboración: propia.

3.3 Porcentaje de emergencia de los tratamientos pos cosecha aplicados a frutos de *Vaccinium corymbosum* (Arándano)

A continuación, se detallan los datos obtenidos en cuanto porcentaje de emergencia de cotiledones, de semillas emergidas con hojas verdaderas, número de nudos y longitud de tallos, para los tratamientos aplicados al fruto.

a) Emergencia de cotiledones

Para la evaluación del porcentaje de emergencia se escogió el grupo de semillas que germinaron hasta la semana 10 (tabla 3.1), y se determinó cual fue el porcentaje de emergencia de esas semillas desde la semana 10 hasta la semana 18, en la tabla 3.4 se aprecian los datos obtenidos, en cuanto a emergencia de cotiledones. Los resultados con repeticiones se muestran en el anexo 5.

Tabla 3.4 Número y Porcentaje de emergencia de semillas con cotiledones de *Vaccinium corymbosum* (Arándano) con 3 repeticiones por tratamiento aplicado a frutos. (T1: maduración del fruto al ambiente), T2: maduración del fruto con etileno, T3: maduración del fruto en macerado y T4: frutos tratados con frio) hasta la semana 18.

Tratamientos	Número y porcentaje	EVALUACION (Semanas)								
		10	11	12	13	14	15	16	17	18
T1	\bar{x}	0,3	2	3	3	3	3	3	3	3
	%	9	64	73	73	82	82	82	82	82
T2	\bar{x}	0	1	2	2	2	2	3	3	3
	%	0	27	41	54	54	54	68	68	68
T3	\bar{x}	13	14	14	14	14	14	14	14	14
	%	81	87	91	91	91	91	91	91	91
T4	\bar{x}	9	10	10	10	10	10	10	10	10
	%	72	74	77	79	79	79	79	79	79

Los resultados de porcentaje de emergencia de semillas con cotiledones alcanzados hasta la semana 18 fueron 82 %, 68 %, 91 % y 79 % para los tratamientos aplicados a frutos T1, T2, T3 y T4 respectivamente, destacándose

el T3 como el tratamiento de mayor porcentaje de emergencia y T2 el de menor porcentaje.

En la figura 3.11 se puede observar cómo se desarrolló la emergencia de las semillas hasta desarrollar cotiledones, este proceso fue ascendente y alcanzó un desarrollo máximo hasta la semana 16.

Para el tratamiento control el porcentaje de emergencia fue creciente entre la semana 10 y 15, para el tratamiento con etileno entre la semana 10 y 16, para el tratamiento con Fermentación en la décima semana ya contaba con una emergencia de 80.8 %, la cual se desarrolló hasta la semana 12 y luego se estabilizó en 92 %, para el tratamiento 4 el desarrolló a la décima semana fue de 71.8 % y alcanzó la máxima emergencia en la semana 13, estabilizándose en 83.3 %.

El periodo de tiempo que transcurre entre el momento en que la semilla germina y en el que la plántula se establece como un organismo independiente es una de las fases decisivas y más delicadas, la mortandad en esta etapa es grande y sólo unas cuantas semillas llegan a establecerse¹². El porcentaje de semillas no emergidas fueron de: 16.7%, 32 %, 8.5 % y 16.7 % para los tratamientos aplicados a frutos T1, T2, T3 y T4 respectivamente, lo que nos indica que estas semillas que empezaron su germinación, murieron en el camino. La mayoría de nuestros resultados no muestra un gran porcentaje de mortandad, a excepción del T2, lo que nos indica que las semillas en su estado más susceptible se vieron afectadas por algún estímulo externo.

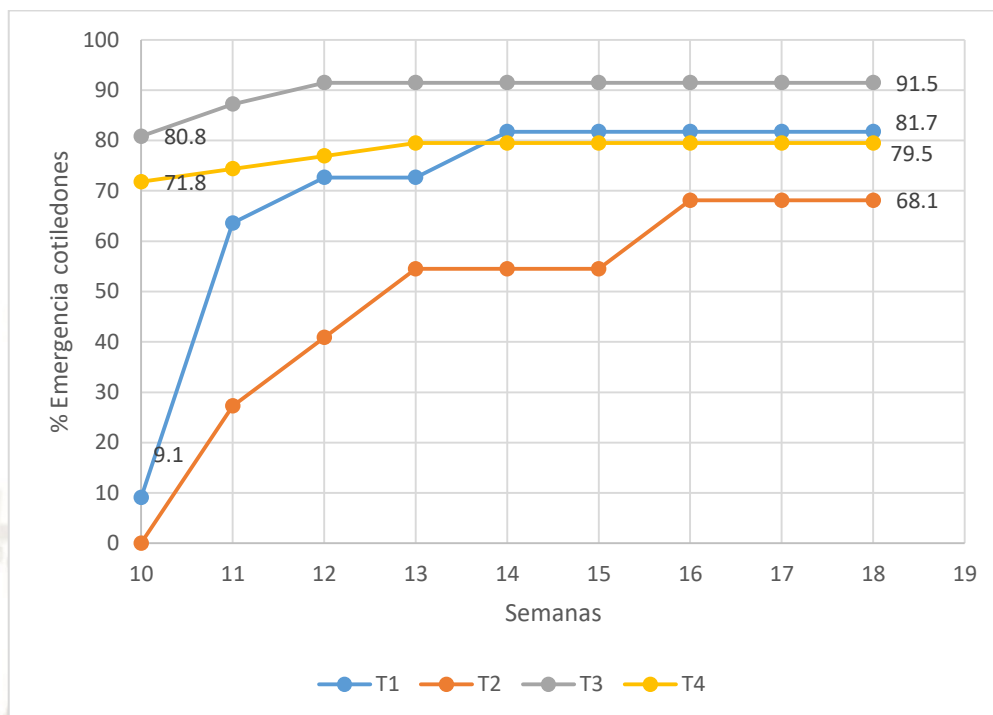


Figura 3.11. Porcentaje de emergencia de semillas con cotiledones de *Vaccinium corymbosum* (Arándano) con 3 repeticiones por tratamiento aplicado a frutos. (T1: maduración del fruto al ambiente, T2: maduración del fruto con etileno, T3: maduración del fruto en macerado y T4: frutos tratados con frio) hasta la semana 18

En condiciones fisicoquímicas apropiadas, el proceso de germinación en arándano comienza con la aparición de la radícula entre los 14 y 21 días de cultivo y posteriormente la aparición de los cotiledones a partir de los 35 días¹⁴. Nuestros resultados se asemejan y mejoran dicha afirmación ya que el tratamiento 3 presentó plántulas con cotiledones libres desde la cuarta semana (28 días).

b) Número y porcentaje de semillas emergidas que desarrollaron hojas verdaderas de tratamientos aplicados a frutos

Del grupo de semillas emergidas, se evaluó cuántas de ellas desarrollaron hojas verdaderas.

En el tratamiento control solo se encontraron los cotiledones, a lo largo de las 18 semanas estas plántulas no desarrollaron hojas verdaderas en ninguna de las repeticiones.

En el tratamiento con etileno solo una plántula obtuvo hojas verdaderas. En el tratamiento con fermentación la mayoría de plántulas desarrollaron hojas verdaderas progresivamente como se observa en la figura 3.12.



Figura 3.12. Plántulas de *Vaccinium corymbosum* (Arándano), tratamiento 3

Los resultados fueron 0 %, 9 %, 95 % y 46 % de emergencia de semillas con hojas verdaderas para los tratamientos aplicados a frutos T1, T2, T3 y T4 respectivamente. Lo que nos sugiere que el tratamiento con mejores resultados fue el T3, seguido del T4, T2 y T1.

En la tabla 3.5, se detalla el número y porcentaje de semillas emergidas con hojas verdaderas obtenidas en los cuatro tratamientos aplicados a frutos. Los resultados con repeticiones se muestran en el anexo 6.

Tabla 3.5. Número y porcentaje de semillas emergidas de *Vaccinium corymbosum* (Arándano) con hojas verdadera con tres repeticiones. T1: maduración del fruto al ambiente), T2: maduración del fruto con etileno, T3: maduración del fruto en macerado y T4: frutos tratados con frio hasta la semana 18.

Tratamientos	Número y porcentaje	EVALUACION (Semanas)									
		10	11	12	13	14	15	16	17	18	
T1	\bar{x}	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T2	\bar{x}	0	0	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
	%	0	0	9	9	9	9	9	9	9	9
T3	\bar{x}	5	7	10	12	13	13	14	14	14	
	%	33	46	66	80	84	86	91	91	95	
T4	\bar{x}	0.3	2	2	3	5	6	6	6	6	
	%	2.6	13	18	21	38	46	46	46	46	

En la figura 3.13, se observa que el número de semillas con emergencia de hojas verdaderas fue ascendente y progresiva para los tratamientos 3 y 4, mientras que para el tratamiento 2 fue muy bajo y prácticamente lineal y para el T1 fue nulo. Así mismo, el tratamiento con mayor número de semillas emergidas que desarrollaron hojas verdaderas fue el tratamiento 3 (fermentación) con 95 % (14 plántulas), seguido del tratamiento 4 (con frio a 4°C) con 46 % (6 plántulas).

El tratamiento 3 (fermentación) muestra una curva creciente de desarrollo de plántulas con hojas verdaderas desde la semana 7 hasta la semana 18, mientras que el T4 (con frio a 4°C) desde la semana 11 hasta la semana 15; mostrando que en todo momento el tratamiento 3 fue sobresaliente.

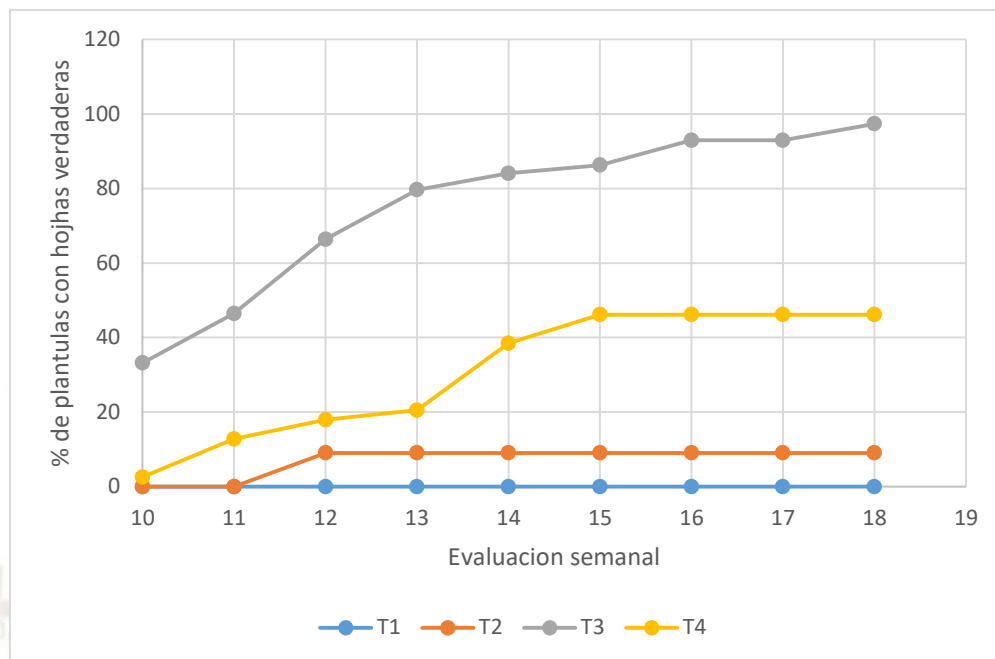


Figura 3.13. Porcentaje de semillas emergidas de *Vaccinium corymbosum* (Arándano) con hojas verdaderas, en tratamientos aplicados a frutos. (T1: maduración del fruto al ambiente), T2: maduración del fruto con etileno, T3: maduración del fruto en macerado y T4: frutos tratados con frío) hasta la semana 18

En la tabla 3.6 se muestran los resultados de número de semillas emergidas con hojas verdaderas considerando el número de hojas obtenidas hasta la semana 18, para los tratamientos aplicados a frutos.

Tabla 3.6. Número promedio de semillas emergidas considerando número de hojas verdaderas en la semana 18, proveniente de tratamiento a frutos. T2: maduración del fruto con etileno, T3: maduración del fruto en macerado y T4: frutos tratados con frío

TRATAMIENTOS	NUMERO DE HOJAS VERDADERAS									Total de semillas emergidas con HV
	1	2	3	4	5	6	7	9	13	
T2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
T3	0	0	3	3	2	3	1	1	1	14
T4	3	2	1	0	0	0	0	0	0	6

*Los resultados para tratamiento 1 no se muestran ya que fueron nulos.

El tratamiento que desarrolló mayor cantidad de hojas verdaderas fue T3 con 14 plántulas (dentro de las cuales desarrollaron desde 3 hasta 13 hojas verdaderas), seguido del T4 con 6 plántulas (desde 1 hasta 3 hojas verdaderas).

En resumen, del grupo de semillas germinadas hasta la semana 10, en el tratamiento 1 germinaron un total de 4 semillas de las cuales 3 presentaron cotiledones y ninguna hoja verdadera hasta la semana 18. En el tratamiento 2 germinaron un total de 11 semillas de las cuales 3 presentaron cotiledones y de las tres una desarrolló hojas verdaderas hasta la semana 18.

En el tratamiento 3 germinaron un total de 15 semillas de las cuales 14 presentaron cotiledones y las 14 desarrollaron hojas verdaderas hasta la semana 18. Y finalmente en el tratamiento 4 germinaron un total de 13 semillas de las cuales 10 presentaron cotiledones y 6 de ellas desarrollaron hojas verdaderas hasta la semana 18.

De estos resultados se infiere que los tratamientos aplicados de alguna manera podrían haber influenciado en el desarrollo de las semillas emergidas ya que presentaron cotiledones, pero no hojas verdaderas hasta la semana 18, o también podría deberse a la propia composición del medio de cultivo.

c) Número y porcentaje de semillas emergidas con nudos de tratamientos aplicados a frutos

Del grupo de semillas emergidas a partir de la semana 10, se evaluó el número de nudos desarrollados al mismo tiempo que el número de hojas.

En el tratamiento 1 solo se encontraron los cotiledones, por lo tanto, solo desarrollaron hasta un máximo de 1 nudo.

En el tratamiento 2 solo una plántula obtuvo hojas verdaderas, por lo tanto, esa es la única que desarrolló más de un nudo. En el tratamiento 3 la mayoría de plántulas desarrollaron hojas verdaderas y más de un nudo por plántula.

Los resultados fueron 82 %, 68 %, 91 % y 79 % de semillas emergidas con nudos para los tratamientos aplicados a frutos T1, T2, T3 y T4 respectivamente. Lo que nos sugiere que el tratamiento con mejores resultados fue el T3.

El tratamiento 1 muestra el segundo porcentaje más alto obtenido para número de nudos desarrollados, pero esto se debe a la presencia de semillas emergidas con cotiledones los cuales sumaron en el conteo de nudos.

A continuación, en la tabla 3.7, se detalla el número y porcentaje de nudos en semillas emergidas en los cuatro tratamientos aplicados a frutos. Los resultados con repeticiones se muestran en el anexo 7.

Tabla 3.7. Número y Porcentaje de semillas emergidas con nudos de *Vaccinium corymbosum* (Arándano) con 3 repeticiones por tratamiento aplicado a frutos. (T1: maduración del fruto al ambiente), T2: maduración del fruto con etileno, T3: maduración del fruto en macerado y T4: frutos tratados con frío) hasta la semana 18

Tratamientos	Número y porcentaje	EVALUACION (Semanas)									
		10	11	12	13	14	15	16	17	18	
T1	\bar{x}	0.3	2	3	3	3	3	3	3	3	
	%	9	64	73	73	82	82	82	82	82	
T2	\bar{x}	0	1	2	2	2	2	3	3	3	
	%	0	27	41	54	54	54	68	68	68	
T3	\bar{x}	13	14	14	14	14	14	14	14	14	
	%	81	87	91	91	91	91	91	91	91	
T4	\bar{x}	9	10	10	10	10	10	10	10	10	
	%	72	74	77	79	79	79	79	79	79	

El número de nudos fue correlativo al número de hojas desarrolladas, las distribuciones de las hojas fueron alternadas, exceptuando las hojas cotiledonales y las del segmento apical.

El tratamiento que desarrolló mayor cantidad de semillas emergidas con mayor número de nudos fue T3 con 14 plántulas que desarrollaron hasta 10 nudos, seguido del T4 con 6 plántulas que desarrollaron hasta 2 nudos. T1 y T2 no tuvieron el mismo tipo de desarrollo ya que solo se encontraron plántulas con 1 nudo, lo que nos indica y corrobora los resultados obtenidos en emergencia de hojas que solo desarrollaron hojas cotiledonales.

d) Longitud de tallos de tratamientos aplicados a frutos

En la tabla 3.8 se reportan la longitud de los tallos de las semillas emergidas desde la semana 10 hasta la 18, en el anexo 8 se presenta las repeticiones. Las semillas emergidas que alcanzaron mayor tamaño fueron las pertenecientes al tratamiento 3 con un promedio de 14 mm o 1.4 cm. a las 18 semanas, seguido del T4 con 12 mm o 1.2 cm. y los tratamientos con menores resultados T1 y T2 con 4 y 3 mm respectivamente.

Pereira³⁵ reportó una longitud de explante de 10.1 mm de *Vaccinium cylindraceum* en medio de cultivo Zimmerman sin regulador hormonal al cabo de 12 semanas de cultivo. Por otro lado, Castro, Olarte² et al. en 2012 reportaron para *Vaccinium meridionale* una altura promedio de 12 mm de las semillas emergidas a las 12 semanas de cultivo en medio MS 1/3 y provenientes de frutos fermentados. Comparando estos resultados con los nuestros a las 12 semanas se observa (tabla 3.10) que los hallazgos del presente trabajo respecto a T3 se encuentran en el rango de tamaño obtenidos por los autores referentes.

Tabla 3.8. Longitud (mm) promedio de tallos de semillas emergidas de *Vaccinium corymbosum* (Arándano) con 3 repeticiones por tratamiento aplicado a frutos. (T1: maduración del fruto al ambiente), T2: maduración del fruto con etileno, T3: maduración del fruto en macerado y T4 frutos tratados con frío) hasta la semana 18.

TRATAMIENTOS	EVALUACION (Semanas)								
	10	11	12	13	14	15	16	17	18
T1	2	2	2	2	3	3	4	4	4
T2	1	1	2	2	2	2	3	3	3
T3	10	10	11	12	12	12	13	13	14
T4	3	4	5	6	8	9	11	12	12

3.4 Efecto de tratamiento de semillas de *Vaccinium corymbosum* (arándano) con AG₃ en el porcentaje de emergencia

A continuación, se detallan los datos obtenidos en cuanto porcentaje de emergencia de cotiledones, de semillas emergidas con hojas verdaderas, número de nudos y longitud de tallos, para los tratamientos pregerminativos aplicados a semillas, para lo cual se seleccionó el grupo de semillas germinadas hasta la semana 10, a partir de las cuales se realizó la evaluación de emergencia.

a) Emergencia de cotiledones

Para la evaluación del porcentaje de emergencia se escogió el grupo de semillas que germinaron hasta la semana 10 (tabla 3.2), y se determinó cual fue el porcentaje de emergencia de esas semillas desde la semana 10 hasta la semana 18, en la tabla 3.9 se aprecian los datos obtenidos. Los resultados con repeticiones se muestran en el anexo 9.

Tabla 3.9. Número y Porcentaje de emergencia de semillas de *Vaccinium corymbosum* (Arándano) con cotiledones, con 3 repeticiones por tratamiento aplicado a semillas. (T_s1: control, T_s2: semillas con 5 µM AG₃, T_s3: semillas con 10 µM AG₃, T_s4: semillas con 15 µM AG₃ y T_s5: semillas con 20 µM AG₃) hasta la semana 18.

Tratamiento	Número y Promedio	EVALUACION (Semanas)								
		10	11	12	13	14	15	16	17	18
T _s 1	\bar{x}	1	1	3	3	4	4	4	4	4
	%	17	33	67	83	92	92	92	92	92
T _s 2	\bar{x}	0.3	1	4	7	11	12	12	12	12
	%	3	5	31	54	87	95	95	95	95
T _s 3	\bar{x}	0.3	0.3	0.3	1	1	1	1	1	1
	%	33	33	33	67	100	100	100	100	100
T _s 4	\bar{x}	0	0.3	1	1	2	2	2	2	2
	%	0	17	33	50	83	83	83	83	83
T _s 5	\bar{x}	1	1	1	1	1	2	2	2	2
	%	33	33	50	67	67	83	83	83	83

Los resultados de porcentaje de emergencia de cotiledones alcanzados hasta la semana 18 fueron 92 %, 95 %, 100 %, 83 % Y 83 % para los tratamientos aplicados a semillas T_s1, T_s2, T_s3, T_s4 y T_s5 respectivamente, contando los 3 primeros con un buen porcentaje de emergencia de cotiledones, se puede inferir que no hubo relación y/o influencia de las concentraciones hormonales en la emergencia de cotiledones.

En la figura 3.14 se puede observar cómo se desarrolló la emergencia de las semillas, este proceso fue ascendente y alcanzó un desarrollo máximo hasta la semana 15.

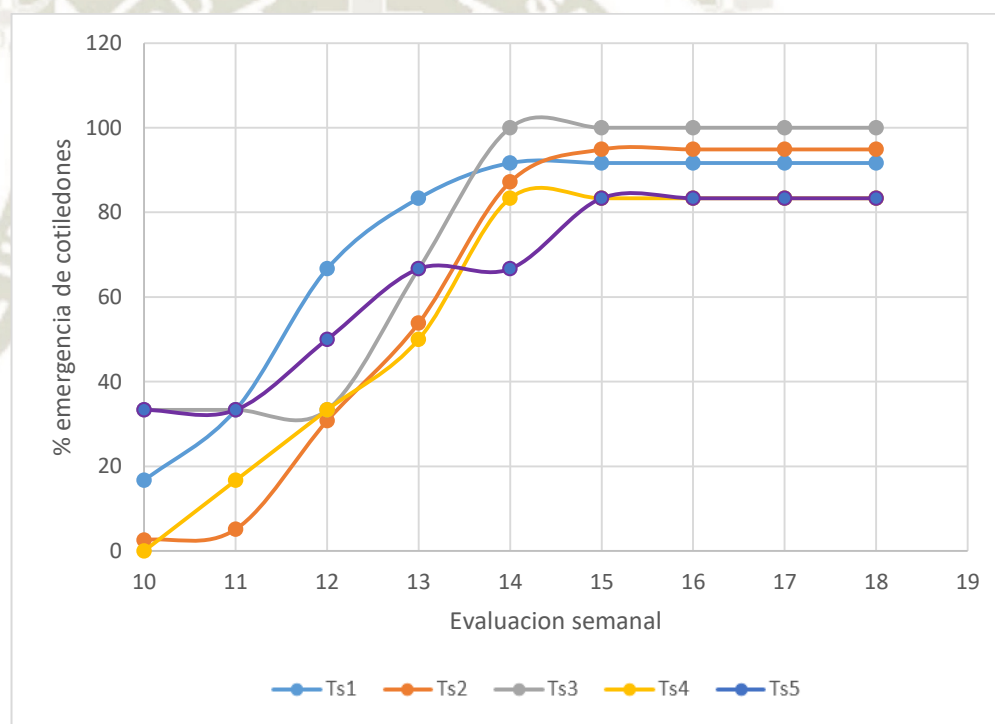


Figura 3.14. Porcentaje de emergencia de semillas con cotiledones de *Vaccinium corymbosum* (Arándano) con 3 repeticiones por tratamiento aplicado a semillas. (1: control, 2: semillas con 5 μM AG₃, 3: semillas con 10 μM AG₃, 4: semillas con 15 μM AG₃ y 5: semillas con 20 μM AG₃) hasta la semana 18.

Para T_s1 el porcentaje de emergencia es creciente entre la semana 10 y 15, para el T_s2 entre la semana 10 y 15 igualmente, para T_s3 se destaca que en la semana 10 solo existió una semilla germinada por lo tanto el porcentaje de emergencia

desarrollado del 100 % hace referencia a esa única semilla, para T_s4 y T_s5 el desarrollo fue creciente entre la décima y quinceava semana.

El periodo de tiempo que transcurre entre el momento en que la semilla germina y en el que la plántula se establece como un organismo independiente es una de las fases decisivas y más delicadas, la mortandad en la etapa es grande y sólo unas cuantas semillas llegan a establecerse¹². El porcentaje de semillas no emergidas fueron de: 8%, 5 %, 0 %, 17 % y 17 % para T_s1, T_s2, T_s3, T_s4 y T_s5 respectivamente, lo que nos indica que estas semillas que empezaron su germinación, murieron en el camino. La mayoría de nuestros resultados no muestra un gran porcentaje de mortandad.

b) Número y porcentaje de semillas emergidas que desarrollaron hojas verdaderas de tratamientos aplicados a semillas

Del grupo de semillas emergidas se evaluó cuantas de ellas desarrollaron hojas verdaderas. En T_s1 se obtuvo un 75% de hojas verdaderas, en el T_s2 un 69 %, en T_s3 un 50 %, en T_s4 y T_s5 33 %. Los tratamientos que desarrollaron mayor porcentaje de hojas verdaderas fueron T_s1 Y T_s2, es decir el control sin concentración hormonal y el tratamiento con 5 µM de AG₃. Los resultados numéricos se detallan en la tabla 3.10 y las repeticiones en el anexo 10.

Tabla 3.10. Número y Porcentaje de semillas emergidas de *Vaccinium corymbosum* (Arándano) con hojas verdaderas, con 3 repeticiones por tratamiento aplicado a semillas. (T_s1: control, T_s2: semillas con 5 µM AG₃, T_s3: semillas con 10 µM AG₃, T_s4: semillas con 15 µM AG₃ y T_s5: semillas con 20 µM AG₃) hasta la semana 18.

TRATAMIENTO		EVALUACION (Semanas)								
		10	11	12	13	14	15	16	17	18
T _s 1	\bar{x}	0	0	0.3	1	1	1	3	3	3
	%	0	0	8.3	17	17	33	67	75	75
T _s 2	\bar{x}	1	1	1	1	1	2	2	6	9
	%	8	8	8	10	10	15	18	44	69
T _s 3	\bar{x}	0	0	0	0	0.3	0.3	0	1	1
	%	0	0	0	0	33	33	33	100	100

T_s4	\bar{x}	0	0	0	0	0	0.3	1	1	1
	%	0	0	0	0	0	17	33	33	33
T_s5	\bar{x}	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	%	0	0	0	0	0	0	0	0	33

En la figura 3.15, se observa que el número de semillas emergidas con hojas verdaderas fue ascendente y progresiva para los tratamientos T_s1, T_s2, T_s3 y T_s4 y desarrollaron hojas verdaderas entre la semana 13 y 17, mientras que para el tratamiento T_s5 fue muy bajo y prácticamente lineal, mostrando una pequeña ascendencia en la semana 17 lo que nos indica que su desarrollo fue más lento.

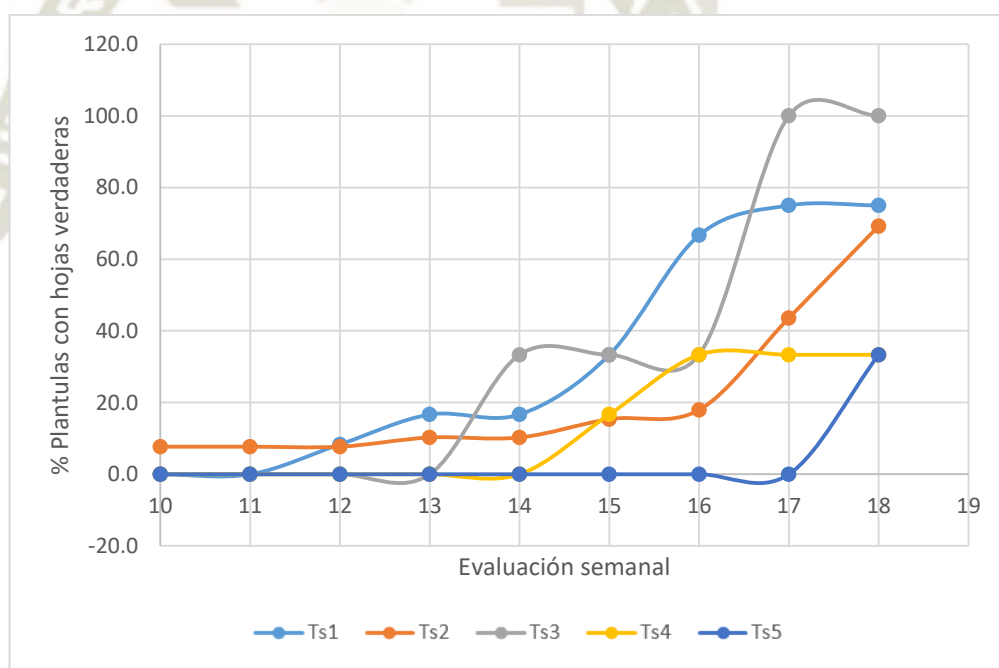


Figura 3.15. Porcentaje de semillas emergidas de *Vaccinium corymbosum* (Arándano) con hojas verdaderas en tratamientos aplicados a semillas. (1: control, 2: semillas con 5 μM AG₃, 3: semillas con 10 μM AG₃, 4: semillas con 15 μM AG₃ y 5: semillas con 20 μM AG₃) hasta la semana 18.

En la tabla 3.11 se muestran los resultados de número de semillas emergidas considerando el número de hojas verdaderas.

Tabla 3.11. Número promedio de semillas emergidas por número de hojas verdaderas en la semana 18, proveniente de tratamientos a semillas. (1: control, 2: semillas con 5 μM AG_3 , 3: semillas con 10 μM AG_3 , 4: semillas con 15 μM AG_3 y 5: semillas con 20 μM AG_3)

TRATAMIENTOS	NUMERO DE HOJAS VERDADERAS			Total de semillas emergidas con HV
	1	2	3	
T_s1	2	1	1	4
T_s2	5	3	0	8
T_s3	1	0	0	1
T_s5	1	0	0	1

*Los resultados para tratamiento “4” no se muestran ya que fueron nulos.

El tratamiento que desarrolló mayor cantidad de plántulas con hojas verdaderas fue el T_s2 tanto de 1, como de 2 hojas verdaderas, seguido del T_s1 con 1,2 y 3 hojas verdaderas, luego en T_s3 con 1 y 3 hojas verdaderas, T_s4 con resultados nulos y T_s5 con solo plántulas de 1 hoja verdaderas. Además, en el T_s1 germinaron un total de 4 semillas de las cuales las 4 desarrollaron cotiledones y una de ellas hojas verdaderas; en el T_s2 de un total de 13 semillas germinadas, 12 desarrollaron cotiledones y de esas 9 desarrollaron hojas verdaderas; en el T_s3 de un total de 1 semilla germinada esa única desarrolló cotiledones y hojas verdaderas; finalmente, en T_s4 y T_s5 de un total de 2 semillas germinadas por tratamiento, las 2 desarrollaron cotiledones y una sola obtuvo hojas verdaderas.

c) Número y porcentaje de semillas emergidas con nudos de los tratamientos aplicados a semillas

Del grupo de semillas emergidas a partir de la semana 10, se evaluó el número de nudos desarrollados al mismo tiempo que el número de hojas.

Los resultados fueron 92 %, 95 %, 100 %, 98, y 83 % de semillas emergidas con nudos para los tratamientos aplicados a semillas T_s1, T_s2, T_s3, T_s4 y T_s5 respectivamente. El número de nudos fue correlativo al número de hojas desarrolladas, las distribuciones de las hojas fueron alternadas, exceptuando las hojas cotiledonales y las del segmento apical. Los resultados se pueden apreciar en la tabla 3.12. Los resultados con repeticiones se muestran en el anexo 11.

Tabla 3.12. Número y Porcentaje de semillas emergidas con nudos, de *Vaccinium corymbosum* (Arándano), con 3 repeticiones por tratamiento aplicado a semillas. (T_s1: control, T_s2: semillas con 5 μM AG₃, T_s3: semillas con 10 μM AG₃, T_s4: semillas con 15 μM AG₃ y T_s5: semillas con 20 μM AG₃) hasta la semana 18.

Tratamiento	Número y Porcentaje	EVALUACION (Semanas)									
		10	11	12	13	14	15	16	17	18	
T _s 1	\bar{X}	1	1	3	3	4	4	4	4	4	
	%	18	36	72	90	92	92	92	92	92	
T _s 2	\bar{X}	0.3	1	4	7	11	12	12	12	12	
	%	3	5	30	53	85	95	95	95	95	
T _s 3	\bar{X}	0.3	0.3	0.3	1	1	1	1	1	1	
	%	33	33	33	67	100	100	100	100	100	
T _s 4	\bar{X}	0	0.3	1	1	2	2	2	2	2	
	%	0	20	39	59	98	98	98	98	98	
T _s 5	\bar{X}	1	1	1	1	1	2	2	2	2	
	%	33	33	50	67	67	83	83	83	83	

En la figura 3.16 se observa una plántula característica del tratamiento 2, demostrando la distribución alterna de hojas.



Figura 3.16. Plántula de *Vaccinium corymbosum* (arándano) cultivada in vitro, proveniente de tratamiento con 5 μM AG₃ aplicado a semillas. Se observa distribución de hojas y nudos.

d) Longitud de tallos, en plántulas de tratamientos aplicados a semillas

En la tabla 3.13 se reportan los tamaños de los tallos en milímetros (mm.) de las semillas emergidas desde la semana 10 hasta la 18. Los resultados nos muestran que las semillas emergidas que alcanzaron mayor tamaño fueron pertenecientes a T_s2 con un promedio de 20 mm o 2 cm. a las 18 semanas, seguido del tratamiento control con un tamaño promedio de 11 mm o 1 cm. y los tratamientos con menores resultados T_s3, T_s4 y T_s5 con tamaño promedio de 10, 7 y 4 mm respectivamente. Estos resultados nos indican que el tratamiento que mayor éxito tuvo en cuanto a tamaño de tallos fue T_s2. Los resultados con repeticiones se muestran en el anexo 12.

Tabla 3.13. Longitud de tallos de *Vaccinium corymbosum* (Arándano) en mm. con 3 repeticiones por tratamiento aplicado a semillas. hasta la semana 18. (T_s1: control, T_s2: semillas con 5 μM AG₃, T_s3: semillas con 10 μM AG₃, T_s4: semillas con 15 μM AG₃ y T_s5: semillas con 20 μM AG₃).

TRATAMIENTOS	EVALUACIONES SEMANALES									
	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
T _s 1	3	3	4	9	7	7	9	10	11	
T _s 2	3	3	4	4	5	6	8	8	10	
T _s 3	3	4	4	4	6	6	8	9	10	
T _s 4	0	1	2	6	5	6	10	10	14	
T _s 5	2	2	2	4	4	4	4	4	4	

Jimenez y Abdelnour³¹ en su germinación *in vitro* con regulador AG₃ obtuvieron un tamaño promedio de 10 mm a las 16 semanas después de la siembra de la semillas con solo presencia de cotiledones. Por otro lado, Pereira³⁵ reportó una longitud de explante de 10.1 mm de *Vaccinium cylindraceum* en medio de cultivo Zimmerman sin regulador hormonal al cabo de 12 semanas de cultivo. Comparando estos resultados con los nuestros se observa que son similares a lo reportado por Jimenez y Abdelnour, siendo el T_s2 el que más se asemeja con 8 mm y el tratamiento 5 el más lejano con 4 mm. Estos resultados pueden deberse a la especie de arándano, a las diferentes condiciones de trabajo dadas y a la misma composición del medio.

Resultados estadísticos sobre emergencia

*Prueba de MANOVA para emergencia de cotiledones

Para conocer si existen diferencias significativas en los promedios y porcentaje de semillas emergidas dependiendo de los tratamientos que recibió, se realizó un análisis de MANOVA tomando como variable dependiente el promedio y porcentaje de semillas germinadas y como variables independientes el tipo de tratamiento que recibió cuando fue aplicado al fruto (T1, T2, T3 y T4) y a la semilla (0AG₃, 5AG₃, 10AG₃, 15AG₃ y 20AG₃), ver tabla 3.14.

Para el caso de tratamientos aplicados al fruto, tomando de referencia la Traza de Pillai, el valor para el modelo global fue de $F=11.351$ con un valor de Significancia= $.0001$ lo que indica que se rechaza la hipótesis nula, es decir que hay diferencias significativas entre los distintos tratamientos aplicados al fruto.

Para el caso de tratamientos aplicados a la semilla, tomando de referencia la Traza de Pillai, el valor para el modelo fue de $F=6.996$ con un valor de Significancia= $.0001$ lo que indica que se rechaza la hipótesis nula, es decir que hay diferencias significativas entre los distintos tratamientos aplicados a la semilla.

Tabla 3.14. Pruebas Multivariantes para emergencia de cotiledones

Tratamiento aplicado		Pruebas multivariante ^a					
		Valor	F	Gl de hipótesis	gl de error	Sig.	
Al fruto	Emergencia de cotiledones	Traza de Pillai	1.031	11.351	6.000	64.000	.000
	Emergencia de cotiledones	Traza de Pillai	.823	6.996	8.000	80.000	.000

a. Diseño : Intersección + trat2_eme

b. Estadístico exacto

c. El estadístico es un límite superior en F que genera un límite inferior en el nivel de significación.

Elaboración: propia

Para el caso del promedio de semillas emergidas por el tratamiento aplicado al fruto, la comparación entre el T1, T2, T3 y T4 resultan significativa, lo que indica que existen diferencias en los tratamientos aplicados al fruto para la emergencia de cotiledones, en otras palabras, todos los tratamientos son diferentes de todos.

Para el caso del tratamiento a semilla, la comparación entre el tratamiento 5AG3 contra los Tratamientos 10AG3, 15AG3 y 20AG3 son significativamente diferentes excepto 0AG3. La comparación entre 10AG3 contra 0AG3, 5AG3 Y 20AG3 son significativamente diferentes excepto 15AG3. La comparación entre 15AG3 contra 0AG3 Y 5AG3 resultó significativamente diferentes. La comparación de 20AG3 contra todos los tratamientos resultó significativo excepto con el tratamiento 15AG3. El test de Games Howell mostró que el tratamiento 3 generó más emergencia de cotiledones, seguido del tratamiento 4. Para mayor detalle ver anexo 17, tabla 6.

En la figura 3.17, se aprecia las medias marginales estimadas de cada tratamiento aplicado al fruto, donde claramente desataca el tratamiento 3.

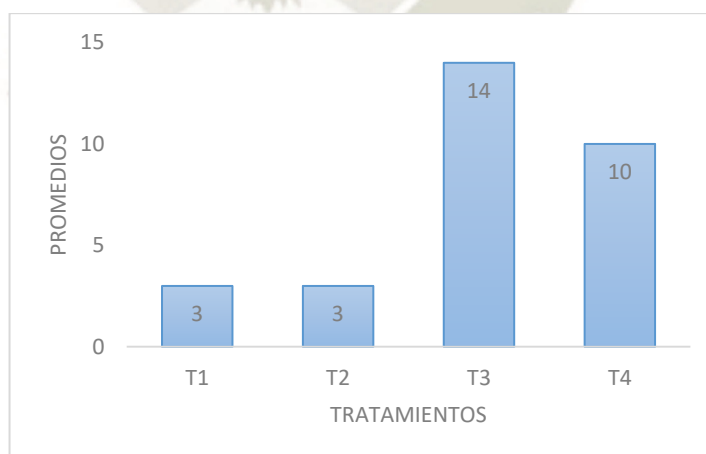


Figura 3.17. Medias marginales del promedio de semillas emergidas para el tratamiento aplicado en frutos.
Elaboración: propia

mediante es test de Games Howell, el tratamiento 5AG₃ es el que genera más semillas con presencia de cotiledones.

En la figura 3.18, se aprecia el promedio de cada tratamiento aplicado a la semilla, donde claramente desataca el tratamiento 2 (5μM AG₃).

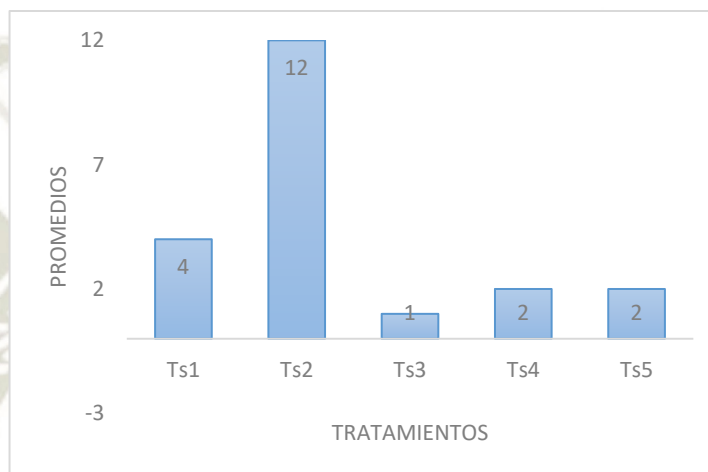


Figura 3.18. Promedio de semillas emergidas para el tratamiento aplicado a la semilla. Elaboración: propia

***Prueba de MANOVA para hojas verdaderas**

Para conocer si existen diferencias significativas en los promedios y porcentaje de hojas verdaderas dependiendo de los tratamientos que recibió, se realizó un análisis de MANOVA tomando como variable dependiente el promedio y porcentaje de hojas verdaderas y como variables independientes el tipo de tratamiento que recibió cuando fue aplicado al fruto (T1, T2, T3 y T4) y a la semilla (0AG₃, 5AG₃, 10AG₃, 15AG₃ y 20AG₃), ver tabla 3.15.

Para el caso de tratamientos aplicados al fruto, tomando de referencia la Traza de Pillai, el valor para el modelo global fue de $F=26.523$ con un valor de Significancia= $.0001$ lo que indica que se rechaza la hipótesis nula, es decir que hay diferencias significativas entre los distintos tratamientos aplicados al fruto.

Para el caso de tratamientos aplicados a la semilla, tomando de referencia la Traza de Pillai, el valor para el modelo fue de $F=4.667$ con un valor de

Significancia=.0001 lo que indica que se rechaza la hipótesis nula, es decir que hay diferencias significativas entre los distintos tratamientos aplicados a la semilla.

Tabla 3.15 Pruebas Multivariantes para hojas verdaderas

			Pruebas multivariante ^a				
Tratamiento aplicado			Valor	F	Gl de hipótesis	gl de error	Sig.
Al fruto	Hojas verdaderas	Traza de Pillai	1.426	26.523	6.000	64.000	.000
	Hojas verdaderas	Traza de Pillai	.636	4.667	8.000	80.000	.000

a. Diseño : Intersección + trat3_hoj

b. Estadístico exacto

c. El estadístico es un límite superior en F que genera un límite inferior en el nivel de significación.

Elaboración: propia

Para el caso del promedio de semillas con hojas verdaderas por el tratamiento aplicado al fruto, la comparación entre el T1, T2, T3 y T4 resultan significativa, lo que indica que existen diferencias en los tratamientos aplicados al fruto para la emergencia de cotiledones, en otras palabras, todos los tratamientos son diferentes de todos.

Para el caso del tratamiento a semilla con hojas verdaderas, no existe diferencia significativa entre tratamientos. Para más detalle ver anexo 17, tabla 7.

El tratamiento 3 (Fermentación) es el que generó más hojas verdaderas, seguido del tratamiento 4.

En la figura 3.19, se aprecia los promedios de cada tratamiento aplicado al fruto en cuanto a hojas verdaderas, donde claramente desataca el tratamiento 3.

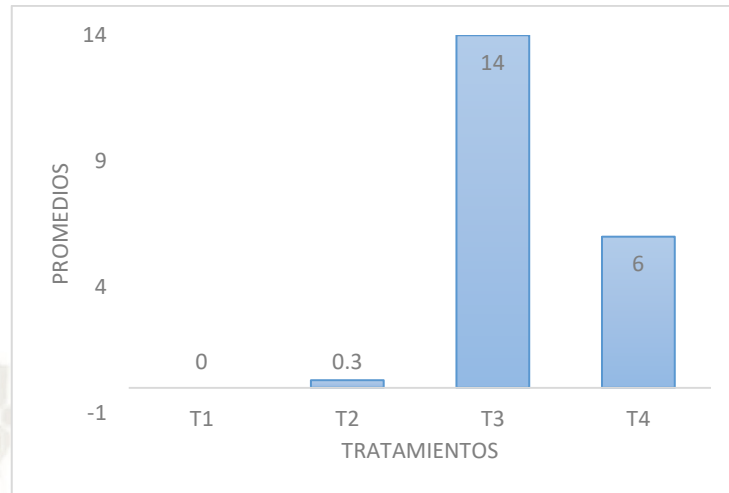


Figura 3.19. Medias marginales del promedio de hojas verdaderas para el tratamiento aplicado en frutos. Elaboración: propia

El tratamiento 5AG₃ es el que genera más hojas verdaderas. En la figura 3.20, se aprecia los promedios de cada tratamiento aplicado a la semilla en cuanto a hojas verdaderas, donde claramente destaca el tratamiento 2 (5μM AG3).

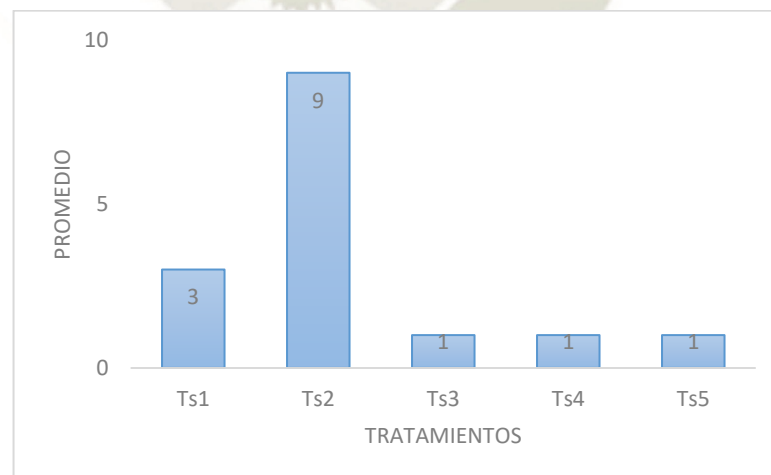


Figura 3.20. Medias marginales del promedio de hojas verdaderas para el tratamiento aplicado a la semilla. Elaboración: propia.

***Prueba MANOVA para nudos**

Para conocer si existen diferencias significativas en los promedios y porcentaje de nudos dependiendo de los tratamientos que recibió, se realizó un análisis de MANOVA tomando como variable dependiente el promedio y porcentaje de nudos y como variables independientes el tipo de tratamiento que recibió cuando fue aplicado al fruto (T1, T2, T3 y T4) y a la semilla (0AG₃, 5AG₃, 10AG₃, 15AG₃ y 20AG₃), ver tabla 3.16.

Para el caso de tratamientos aplicados al fruto, tomando de referencia la Traza de Pillai, el valor para el modelo global fue de $F=28.176$ con un valor de Significancia=.0001 lo que indica que se rechaza la hipótesis nula, es decir que hay diferencias significativas entre los distintos tratamientos aplicados al fruto.

Para el caso de tratamientos aplicados a la semilla, tomando de referencia la Traza de Pillai, el valor para el modelo fue de $F=7.076$ con un valor de Significancia=.0001 lo que indica que se rechaza la hipótesis nula, es decir que hay diferencias significativas entre los distintos tratamientos aplicados a la semilla.

Tabla 3.16. Pruebas Multivariantes para nudos

			Pruebas multivariante ^a				
Tratamiento aplicado			Valor	F	Gl de hipótesis	gl de error	Sig.
Al fruto	Nudos	Traza de Pillai	1.451	28.176	6.000	64.000	.000
	<hr/>						
A la semilla	Nudos	Traza de Pillai	.829	7.076	8.000	80.000	.000

a. Diseño: Intersección + trat4_nud. b. Estadístico exacto. c. El estadístico es un límite superior en F que genera un límite inferior en el nivel de significación.

Elaboración: propia

3.5 Desinfestación de semillas con Hipoclorito de sodio

Tratamiento de desinfestación A: NaClO al 1.25 % por 20, 25 y 30 minutos y tratamiento de desinfestación B: NaClO al 2.5 % por 20, 25 y 30 minutos.

Se evaluó la contaminación por bacterias a los 3 días de la siembra y por hongos a los 7 días y los resultados obtenidos fueron satisfactorios para el tratamiento de desinfestación B.

a) Contaminación por bacterias

Al tercer día de siembra se llevó a cabo la evaluación (ver tabla 3.17) y se observó para el tratamiento de desinfestación A inicio de contaminación bacteriana en la mayoría de las placas, siendo el menor porcentaje de contaminación las placas sometidas a mayor tiempo con Hipoclorito de sodio (30 minutos), y mayor porcentaje de contaminación aquellos sometidos a menor tiempo con Hipoclorito de sodio (20 minutos).

En la desinfestación A se observó mayor contaminación en el grupo de semillas provenientes del pretratamiento con etileno 15,67 %, seguidas de las obtenidas por fermentado y tratamiento a ambiente 13.3 %, esto nos indica que si hubo influencia del pretratamiento utilizado, ya que el pretratamiento con etileno fue mayor en el porcentaje de contaminación de las semillas (ver figura 3.21).

En el segundo tratamiento (B) de desinfestación se aplicó una mayor concentración de Hipoclorito de sodio, y al cabo de los tres días de siembra, se pudo apreciar que no apareció ningún tipo de contaminación en ninguna de las placas, ver tabla 3.17.

Tabla 3.17. Número y porcentaje promedio de semillas contaminadas por bacterias en los tratamientos de desinfección A y B

Tratamiento de semillas en tres tiempos (min) de inmersión en NaClO 1.25 %													
Tratamiento A	Ambiente (min)			Etileno (min)			Fermentado (min)						
	20	25	30	20	25	30	20	25	30	$\bar{x}20$	$\bar{x}25$	$\bar{x}30$	$\bar{x}Total$
Promedio	1.7	1.3	1	2.3	1.7	1	2	1	1	2	1	1	1
Contaminación %	17	13	10	23	17	7	17	13	10				
Promedio por pretratamiento	13.3			15.7			13.3						
Tratamiento de semillas en tres tiempos (min) de inmersión en NaClO 2.50 %													
Tratamiento B	Ambiente (min)			Etileno (min)			Fermentado (min)			$\bar{x}20$	$\bar{x}25$	$\bar{x}30$	$\bar{x}Total$
	20	25	30	20	25	30	20	25	30				
Promedio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Contaminación %	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
Promedio por pretratamiento	0			0			0						

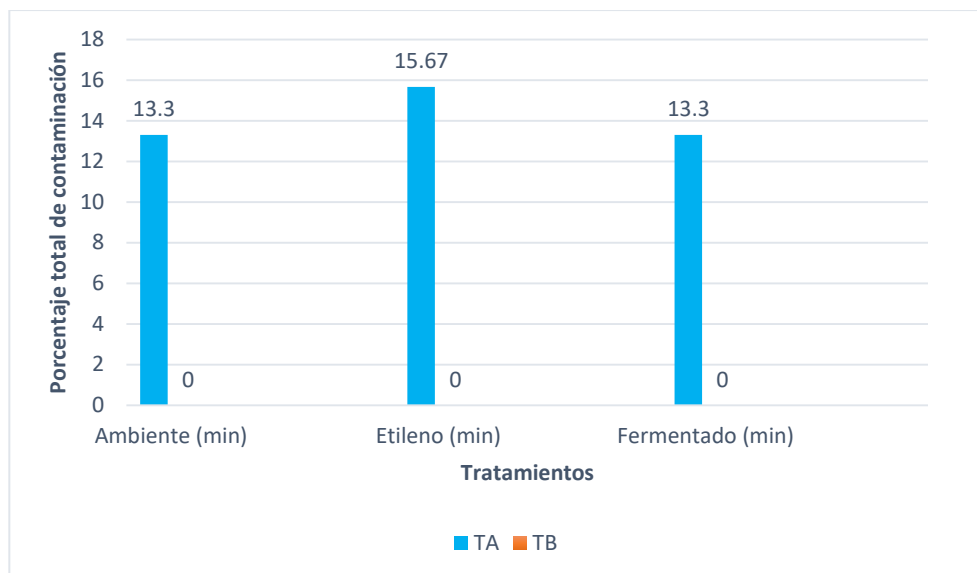


Figura 3.21. Influencia de tratamiento de semillas en el porcentaje de contaminación total de bacterias en las semillas de *Vaccinium corymbosum* (Arándano).

b) Contaminación por hongos

Para la evaluación de contaminación por hongos se esperó 7 días después de la siembra in vitro. Se evidenció solo una semilla contaminada por hongos en la placa proveniente del tratamiento fermentado y desinfectadas con NaClO 1.25 % por 20 minutos logrando así un porcentaje de contaminación del 3 % (1 semilla contaminada), lo que nos sugiere un nivel de contaminación bajo que podría deberse a una mala manipulación en el momento de siembra por parte del investigador.

Con el tratamiento desinfección B no se evidenció ningún tipo de contaminación por hongos, no se muestran los datos porque todos fueron nulos; este resultado corrobora que la contaminación por hongos encontrada en el tratamiento anterior fue error de manipulación y por lo tanto, no fue necesario aplicar en este estudio ningún tratamiento de desinfección específico para hongos.

En la tabla 3.18 se puede observar el porcentaje total de contaminación tanto por hongos y bacterias en los dos tratamientos aplicados. Se expresan los valores en porcentaje de contaminación, tanto para TA (20, 25 y 30 minutos) y TB (20, 25 y 30

minutos), donde el tratamiento con mayor éxito fue el TB (2.5 % NaClO) con 0 % de contaminación tanto para bacterias como para hongos.

Las fotos y tablas con repeticiones pertenecientes a los resultados de contaminación se encuentran en el Anexo 13.

Tabla 3.18. Porcentaje total de contaminación tanto por Bacterias como por Hongos en los tratamientos de desinfestación aplicados a las semillas de *Vaccinium corymbosum* (arándano). TA: 1.25 % NaClO, TB: 2.5 % NaClO.

Tratamientos de NaClO	Tiempo (minutos)	TIPOS DE TRATAMIENTO DEL FRUTO								
		Ambiente			Etileno			Fermentación		
		Bacterias (%)	Hongos (%)	Total	Bacterias (%)	Hongos (%)	Total	Bacterias (%)	Hongos (%)	Total
TA	20	17	0	17	23	0	23	17	3	20
	25	13	0	13	17	0	17	13	0	13
	30	10	0	10	7	0	7	10	0	10
TB	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Los resultados muestran que hay presencia de contaminación cuando la concentración de NaClO es baja (1.25%) en contraste con otras investigaciones³⁶ que utilizan menor concentración de NaClO (1%) y no hay presencia de contaminación, este se puede deber a que ellos utilizaron también etanol 70% previo al proceso de desinfestación con hipoclorito, mientras que en la presente investigación no se requirió de etanol.

Por otra parte, aunque se evidenció contaminación con el porcentaje más bajo de Hipoclorito esta no fue alta, llegando a su máximo de 23% en las semillas provenientes del tratamiento de maduración con etileno, esto se puede deber a que los plátanos utilizados como proveedores de etileno cuentan con su propia flora bacteriana, la cual se pudo haber sumado a la propia flora bacteriana del arándano.

En cambio, en el segundo tratamiento “B” con una concentración del 2.5 %, no se evidenció ningún tipo de contaminación bacteriana, por lo tanto, se utilizó este esta

concentración (NaClO 2.5 %) por el tiempo mínimo evaluado (20 minutos) para el posterior establecimiento in vitro de las semillas.

En otros trabajos se ha utilizado remojo con Benomil 1%, seguido de hipoclorito 0.6 % por 10 min. mas tween-20 al 0.02 % ⁽³⁵⁾, etanol 70 % por 1 min, hipoclorito 0.787 % por 25 min más teewn-20 al 0.1 % ⁽¹⁾. En esta investigación no se utilizó Benomil porque no se consideró necesario.

3.6 Efecto de la concentración de FeEDTA en los medios WP y MS

a) Número de hojas

Se realizó el conteo del número de hojas y nudos en la etapa inicial, así como el tamaño del explante a evaluar por cada tratamiento (medio de cultivo con diferente concentración de quelado FeEDTA).

En la tabla 3.19 se pueden apreciar los resultados obtenidos, en lo que respecta al número promedio de hojas en el que se incrementó cada plántula por repetición por tratamiento, a lo largo de 10 semanas de evaluación. Los resultados con repeticiones se muestran en el anexo 14.

Tabla 3.19. Número de hojas promedio por tratamiento (Medio de cultivo) hasta la décima semana. MS: Murashige & Skoog 1982 con macroelementos a 1/3 de la concentración original. WP: Woody Plant, Lloyd & Brent 1981).

Tratamientos	Evaluación (Semanas)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MS (*1)	0	1	1	2	2	3	3	3	4	4
MS (*2)	0	1	2	2	3	3	4	4	5	5
WP (*1)	0	1	1	2	2	3	3	3	3	4
WP (*2)	0	1	1	2	2	2	3	3	3	4

Microelementos: MS(*1) y WP(*1): FeEDTA (FeSO₄.7H₂O:27.8 mg/L, Na₂EDTA: 37.3 mg/L). MS*2 y WP*2: FeEDTA (FeSO₄.7H₂O: 55.6 mg/L, Na₂EDTA: 74.6 mg/L).

Los resultados muestran que hubo mayor número de hojas en el medio de cultivo MS*2 pero que este no fue significativo respecto de los demás tratamientos (MS*1,

WP*1 y WP*2). El mejor resultado lo obtuvo el medio MS*2 con un promedio de 5 hojas, mientras que MS*1 y el medio WP*1 y WP*2 le siguieron con un promedio de 4 hojas.

En la figura 3.22 se puede apreciar que el crecimiento del número de hojas durante las 10 semanas de evaluación con los medios de cultivo MS y WP y sus diferentes concentraciones de FeEDTA, fue ascendente para todos los medios durante las 10 semanas.

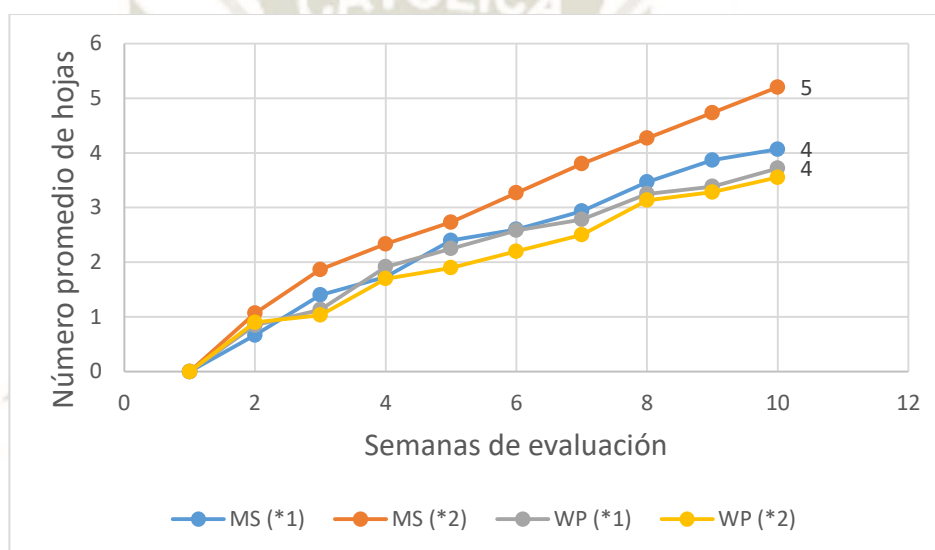


Figura 3.22. Número de hojas promedio por tratamiento con medios de cultivo MS y WP, durante 10 semanas. MS (*1) y WP (*1): FeEDTA ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 27.8 mg/L, Na_2EDTA : 37.3 mg/L). MS*2 y WP*2: FeEDTA ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 55.6 mg/L, Na_2EDTA : 74.6 mg/L).

En la figura 3.23 se puede observar en un gráfico de barras, en el cual el medio que sobresale por tener ligeramente más número de hojas es el medio de cultivo MS(*2), frente a los demás medios. Los resultados nos muestran que la doble concentración de FeEDTA no influyó en el número de hojas de las plántulas cultivadas en condiciones *in vitro*.

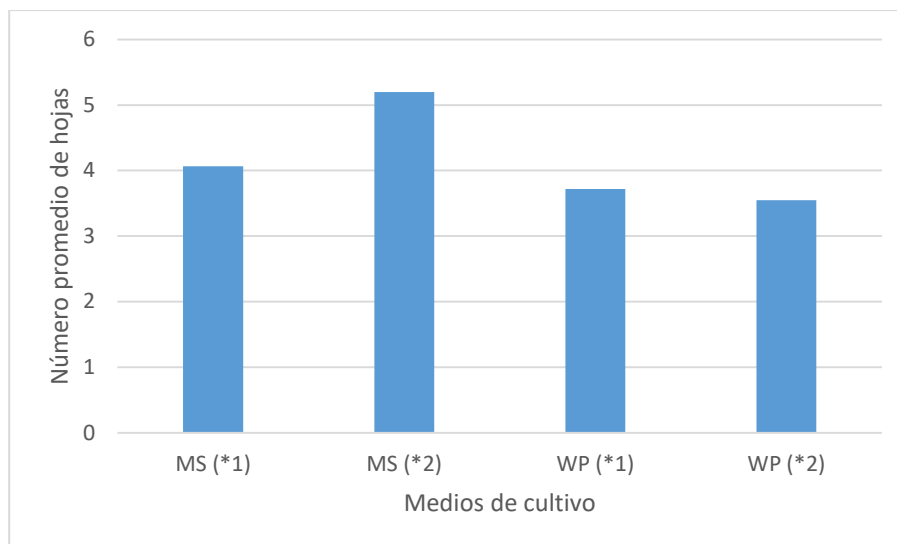


Figura 3.23. Número promedio de hojas que incrementaron por plántula por tratamiento. MS(*1) y WP(*1): FeEDTA ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 27.8 mg/L, Na_2EDTA : 37.3 mg/L). MS*2 y WP*2: FeEDTA ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 55.6 mg/L, Na_2EDTA : 74.6 mg/L).

En la figura 3.24, se aprecia plántulas de *Vaccinium corymbosum* (arándano) representativas de cada tratamiento con medio de cultivo MS y WP a las 10 semanas de su cultivo *in vitro*, donde el medio MS (*2) presentó hojas alternas de una manera más ordenada, con una mejor apariencia en hojas.

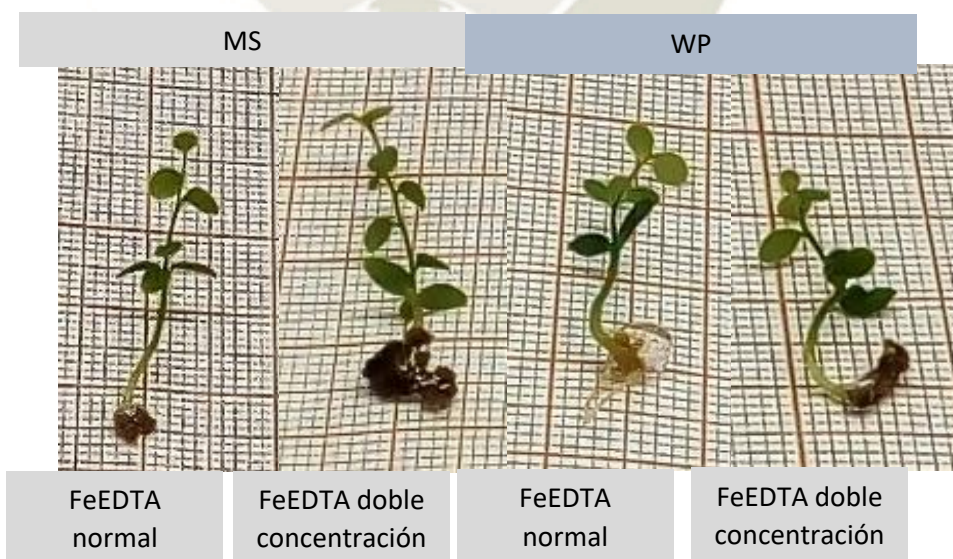


Figura 3.24. Plántulas de *Vaccinium corymbosum* (arándano) a las 10 semanas de cultivo *in vitro* en medios MS 1/3 y WP.

b) Número de nudos

Se realizó el conteo del incremento de nudos después de su siembra en el medio respectivo, los resultados se pueden apreciar en la tabla 3.20. Los resultados con repeticiones se muestran en el anexo 15.

Tabla 3.20. Número promedio de nudos por repetición por tratamiento hasta la sexta semana. MS: Murashige & Skoog 1982), MS/3: MS con macroelementos a 1/3 de la concentración original. WP: Woody Plant, Lloyd & Brent 1981).

Tratamientos	Evaluación (semanas)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MS (*1)	0	0	1	2	2	2	3	3	4	4
MS (*2)	0	1	1	2	3	3	3	4	4	5
WP (*1)	0	0	1	2	2	3	3	4	4	4
WP (*2)	0	0	1	1	1	2	2	3	3	3

Microelementos: MS y WP: FeEDTA (FeSO₄.7H₂O:27.8 mg/L, Na₂EDTA: 37.3 mg/L). MS*2 y WP*2: FeEDTA (FeSO₄.7H₂O: 55.6 mg/L, Na₂EDTA: 74.6 mg/L).

Los resultados obtenidos muestran que el mayor número promedio de nudos lo obtuvo el medio de cultivo MS*2 con 5 nudos promedio por plántula, seguido por el medio MS*1, WP*1 y finalmente WP*2 con 4, 4 y 3 nudos por plántula respectivamente. El resultado en número de nudos es casi correlativo con los resultados de número promedio de hojas.

En la figura 3.25 se puede apreciar de mejor manera los resultados obtenidos, aquí se observa que el número de nudos fue aumentando ascendentemente conforme pasaron las semanas, de la misma manera que el desarrollo de las hojas durante el crecimiento de las plántulas de arándano.

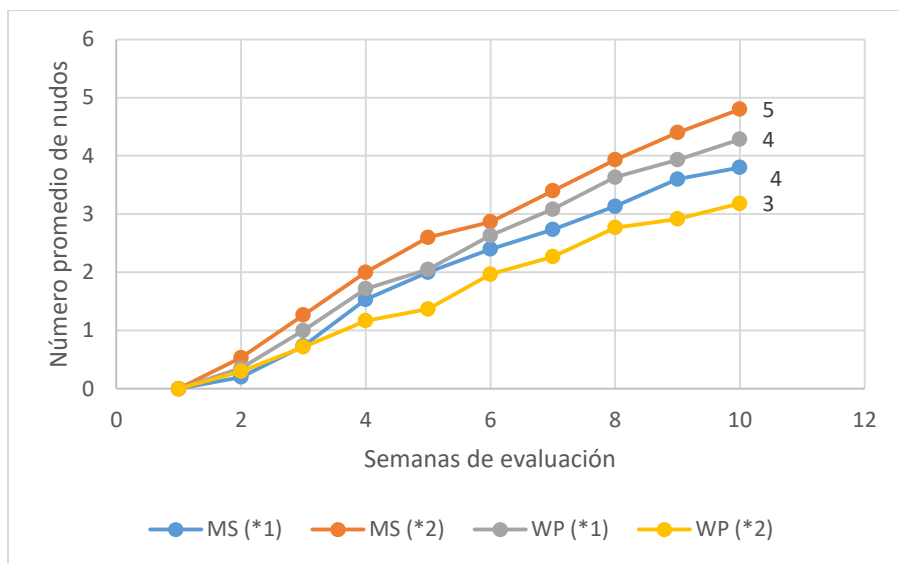


Figura 3.25. Promedio de número de nudos por tratamiento. MS(*1) y WP(*1): FeEDTA ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 27.8 mg/L, Na_2EDTA : 37.3 mg/L). MS*2 y WP*2: FeEDTA ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 55.6 mg/L, Na_2EDTA : 74.6 mg/L).

Así también en la figura 3.26 se puede apreciar en un gráfico de barras, en el cual el medio que sobresale por tener mejor desarrollo en hojas es el medio de cultivo MS(*2), frente a los demás medios. Este medio contiene el doble de concentración de FeEDTA, lo cual en combinación con el propio medio sugiere un mejor desarrollo en cuanto a número de hojas.

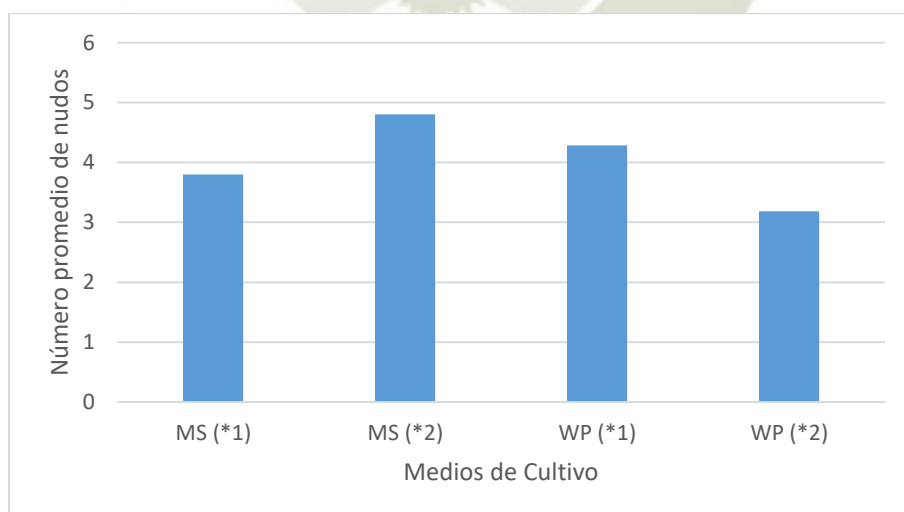


Figura 3.26. Número de nudos promedio que incrementaron por plántula por tratamiento. MS(*1) y WP(*1): FeEDTA ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 27.8 mg/L, Na_2EDTA : 37.3 mg/L). MS*2 y WP*2: FeEDTA ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 55.6 mg/L, Na_2EDTA : 74.6 mg/L).

c) Longitud de tallo

Se realizó la medición de la longitud de los tallos de cada plántula al inicio y final del experimento, luego se calculó la diferencia entre esos valores y se determinó en qué medio de cultivo desarrollaron plántulas con mayor tamaño, como se ve en la tabla 3.21. Los resultados con repeticiones se muestran en el anexo 16.

El mejor resultado lo obtuvo el tratamiento con MS(*2), seguido de MS (*1), WP(*2) y WP (*1), lo que nos indica que el medio con más éxito fue MS(*2), esto podría deberse a que este medio de cultivo a un tercio de la concentración de sus macroelementos cumple con las exigencias del arándano³⁷, además según este medio de cultivo contiene una menor concentración de sulfato de magnesio, lo cual ayuda en el desarrollo de los explantes *in vitro* de arándano³⁸.

Tabla 3.21. Longitud promedio de tallos (mm) al inicio y al final de su cultivo *in vitro* (10 semanas) en medios MS y WP. MS: Murashige & Skoog 19862), MS: MS con macroelementos a 1/3 de la concentración original. WP: Woody Plant, Lloyd & Brent 1980).

	Hi (mm)	Hf (mm)	DIFERENCIA (mm)
MS (*1)	10.73	22.80	12.07
MS (*2)	12.60	26.07	13.47
WP (*1)	10.93	19.87	8.93
WP (*2)	10.33	20.53	10.20

Hi: altura inicial de la plántula, Hf: altura final, a los 10 días de evaluación. Microelementos: MS y WP: FeEDTA (FeSO₄.7H₂O:27.8 mg/L, Na₂EDTA: 37.3 mg/L). MS*2 y WP*2: FeEDTA (FeSO₄.7H₂O: 55.6 mg/L, Na₂EDTA: 74.6 mg/L).

En la figura 3.27 se puede apreciar que destaca el medio MS ya sea con la concentración normal o al doble de FeEDTA.

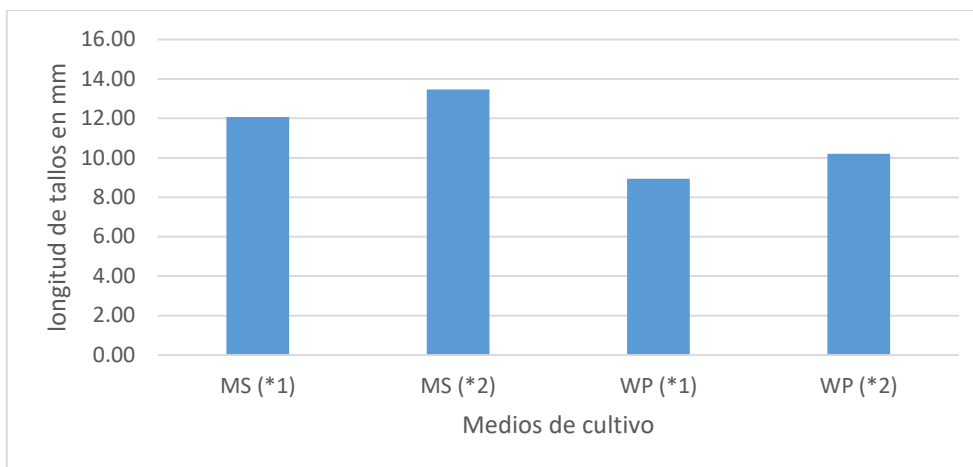


Figura 3.27. Longitud promedio de tallos en mm. A lo largo de 10 semanas de cultivo in vitro en medios MS y WP. Microelementos: MS y WP: FeEDTA ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 27.8 mg/L, Na_2EDTA : 37.3 mg/L). MS*2 y WP*2: FeEDTA ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 55.6 mg/L, Na_2EDTA : 74.6 mg/L).

En la figura 3.28 y 3.29 se muestran las plántulas representativas de cada tratamiento aplicado (MS*1, MS*2, WP*1, WP*2). Donde MS*2 presenta la mejor disposición de hojas, ligeramente mejor apariencia y buen tamaño.

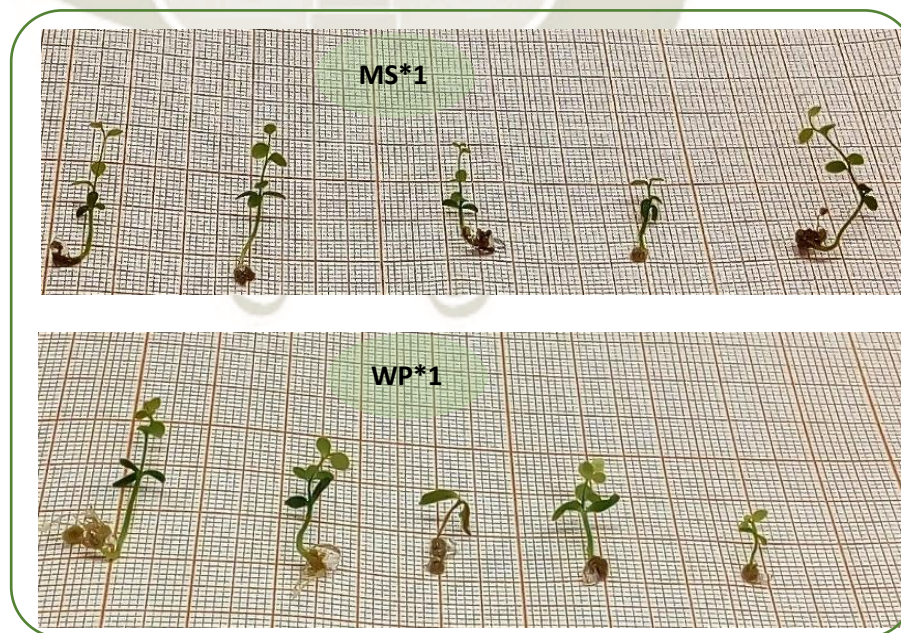


Figura 3.28. Longitud de tallos obtenida después de 10 semanas de crecimiento en medios MS y WP a la concentración normal de FeEDTA. MS (Murashigue con

macronutrientes 1/3 concentración), WP (Woody plant) Donde: MS*1 (FeEDTA*1) y WP*1 (FeEDTA*1)

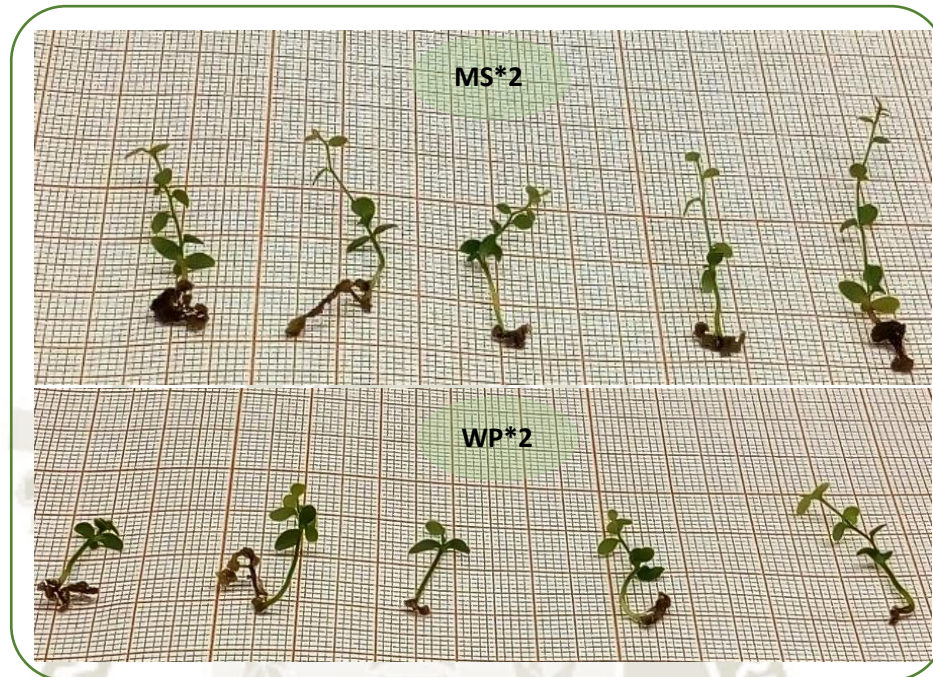


Figura 3.29. Longitud de tallos obtenida después de 10 semanas de crecimiento en medios MS y WP al doble de concentración de FeEDTA. MS (Murashigue con macronutrientes 1/3 concentración), WP (Woody plant) Donde:MS*2 (FeEDTA*2), WP*2 (FeEDTA*2)

d) Apariencia hojas

En cuanto a la apariencia de las hojas la mayoría de las plántulas contaron con hojas de buen color, en todos los tratamientos, pero las presentes en medio con doble concentración de FeEDTA presentaron ligeramente mejor apariencia, siendo más notorio en MS*2.

También, se pudo apreciar algunas plántulas con clorosis como en el caso de WP*1 (figura 3.30).

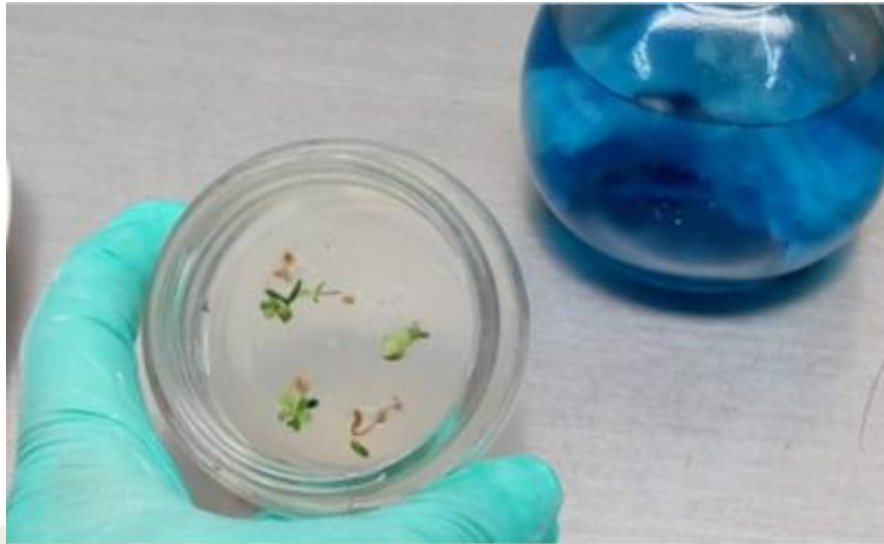


Figura 3.30. *Vaccinium corymbosum* (arándano) cultivado in vitro en medio WP*1 (FeEDTA a su concentración normal) con presencia de clorosis.

La presencia de clorosis también se observó en los demás medios, pero de manera ligera, y fue mucho menos en el medio MS*2 (FeEDTA al doble de su concentración normal), como se observa en la figura 3.31.



Figura 3.31. Plántulas de *Vaccinium corymbosum* (arándano) obtenidas del cultivo in vitro en medio WP*2 (FeEDTA al doble de su concentración normal)

Los primeros estudios de la influencia del aumento de FeEDTA fueron realizados en Raspberry en medio MS y Anderson, mostrando reducción de clorosis. La deficiencia de Fe es un importante problema, ya que causa clorosis debido a la deficiencia de clorofila, afectando directamente en la fotosíntesis de la planta, debido a esto es importante saber que el consumo de Fe proveniente del medio de cultivo es muy rápido⁶.

Zawadzka & Orlikowska⁶ utilizaron el quelato FeEDDHA en cultivo in vitro de Raspberry y sus resultados fueron favorables ya que se redujo la clorosis, aumentó el contenido de hierro y clorofila en la multiplicación de plántulas y no mostró efecto en el número de brotes; mientras que en el presente se utilizó el quelato FeEDTA y mostró buenos resultados en cuanto a número de hojas, nudos y apariencia en el medio MS cuando su concentración fue duplicada. Hart, *et al*³⁹ en la guía de manejo de nutrientes para blueberries manifiestan que la deficiencia de Fe no solo se ve expresada en las hojas a manera de clorosis, sino que también que los tamaños de las mismas son reducidos. Con respecto a esto en este trabajo la doble concentración de FeEDTA no determinó la apariencia o mejora en cuanto a clorosis en arándano ya que las plántulas que crecieron en medio WP*2 no mostraron un mejor aspecto que las cultivadas en WP*1. Mientras que las plántulas cultivadas en MS fueron las que presentaron mejores resultados.

Rache y Pacheco³⁸ utilizaron medio WP y MS/3 (*2) en el cultivo de *Vaccinium meridionale* y destacaron este medio en cuanto a número de yemas y tamaño de microtallos, como el más efectivo debido a que contiene una menor concentración de sulfato de magnesio con respecto al WP. Estos resultados concuerdan con los de la presente investigación, ya que el medio WP mostró los menores valores en todos los resultados.

Resultados estadísticos sobre crecimiento en medio de cultivo MS y WP

Para medir el crecimiento de las hojas, nudos y longitud de las plántulas en diferentes medios de cultivo, se utilizó la prueba T de Student de la diferencia de medias para muestras emparejadas.

Hojas

Ho: Las medias de los diferentes medios de cultivo son iguales

Ha: Las medias de los diferentes medios de cultivo no son iguales

Como se observa en la tabla 3.22 de análisis de ANOVA para los diferentes medios de cultivo y el promedio de hojas total por plántula, los resultados muestran un valor $F= 0.810$ y un valor de significancia de 0.497 mayor a 0.05 lo que indica que no se rechaza la hipótesis nula. Es decir que no existen diferencias entre los medios de cultivos empleados para aumentar el número de hojas en la plántula.

Tabla 3.22. Análisis de ANOVA para los diferentes medios de cultivo y número de hojas

	Suma de cuadrados	gl.	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	4.437	3	1.479	0.810	0.497
Dentro de grupos	65.749	36	1.826		
Total	70.186	39			

La tabla 3.23 muestra el promedio de los diferentes medios de cultivos usados para mejorar el número de nudos en la plántula. Como se puede observar el promedio de MS*2 es el más alto con 4 nudos por plántula.

Tabla 3.23. Promedio de los diferentes medios de cultivos y el número de nudos

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
MS*1	10	3.6467	1.37493	0.43479	2.6631	4.6302	1.67	5.53
MS*2	10	4.0267	1.62456	0.51373	2.8645	5.1888	1.33	6.27
WP*1	10	3.5883	1.45598	0.46042	2.5468	4.6299	1.30	5.45
WP*2	10	3.2400	1.09689	0.34687	2.4553	4.0247	1.73	4.67
Total	40	3.6254	1.37550	0.21749	3.1855	4.0653	1.30	6.27

ANOVA

Como se observa en la tabla 3.24 de análisis de ANOVA para los diferentes medios de cultivo y el promedio de nudos total por plántula, los resultados muestran un valor $F = 0.529$ y un valor de significancia de 0.665 mayor a 0.05 lo que indica que no se rechaza la hipótesis nula. Es decir que no existen diferencias entre los medios de cultivos empleados para aumentar el número de nudos en la plántula.

Tabla 3.24. Análisis de ANOVA para los diferentes medios de cultivo y el promedio de nudos

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3.114	3	1.038	0.529	0.665
Dentro de grupos	70.674	36	1.963		
Total	73.788	39			

La tabla 3.25 muestra los estadísticos descriptivos aplicados a los distintos medios de cultivo y la longitud de los tallos. Las observaciones de los datos se dieron de

acuerdo al promedio de la altura inicial de los tallos y luego se observó la altura final de los tallos después de aplicarle los distintos medios de cultivo.

Tabla 3.25. Estadísticos descriptivos aplicados a los distintos medios de cultivo y la longitud de los tallos

		Media	N	Desviación estándar	Media de error estándar
Hi	MS*1	1.0733	15	.10328	.02667
Hf	MS*1	2.2800	15	.45230	.11678
Hi	MS*2	1.2600	15	.21314	.05503
Hf	MS*2	2.6067	15	.45743	.11811
Hi	WP*1	1.0933	15	.16676	.04306
Hf	WP*1	1.9867	15	.60694	.15671
Hi	WP*2	1.0333	15	.08997	.02323
Hf	WP*2	2.0533	15	.37582	.09704

Nota: Hi: Altura Inicial y Hf: Altura Final

Para el medio de cultivo MS*1, se observa que el promedio de la altura inicial es 1.07 cm y después del tratamiento el promedio es de 2.28 cm. Para el caso del medio de cultivo MS*2 se observa que el promedio de la longitud de tallos inicial es de 1.26 cm para finalmente después del tratamiento tener un promedio de altura de 2.6 cm. Para el caso de tratamiento WP*1 se observa que el promedio inicial de longitud es de 1.09 cm para luego terminar con un promedio de 1.98 cm. Finalmente para el medio de cultivo WP*2 el promedio inicial de longitud es de 1.03 cm para finalmente terminar con un promedio de 2.05 cm.

Prueba de Hipótesis

Ho: No existe diferencia en la longitud de los tallos promedio entre los diferentes medios de cultivos usados.

Ho: Existe diferencia en la longitud de los tallos promedio entre los diferentes medios de cultivos usados.

Como se puede observar en la tabla 3.26, para el medio de cultivo MS*1 el valor T es -10.995 con un valor de significancia menor a 0.05, por lo que se concluye que se rechaza la Hipótesis nula, es decir que existe evidencias suficientes para decir que existe diferencia en la longitud promedio del tallo cuando se aplica el medio de cultivo MS*1.

Tabla 3.26. Prueba de hipótesis

	Diferencias emparejadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Media	Desviación estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
				Inferior	Superior			
Hi - MS*1	-1.20667	0.42505	0.10975	-1.44205	-.97128	-10.995	14	0.000
Hf - MS*1								
Hi - MS*2	-1.34667	0.38520	0.09946	-1.55998	-1.13335	-13.540	14	0.000
Hf - MS*2								
Hi - WP*1	-.89333	0.65516	0.16916	-1.25615	-.53052	-5.281	14	0.000
Hf - WP*1								
Hi - WP*2	-1.02000	0.38023	0.09817	-1.23056	-.80944	-10.390	14	0.000
Hf - WP*2								

Para el medio de cultivo MS*2 el valor T es -13.540 con un valor de significancia menor a 0.05, por lo que se concluye que se rechaza la Hipótesis nula, es decir que existe evidencias suficientes para decir que existe diferencia en la longitud promedio del tallo cuando se aplica el medio de cultivo MS*2.

Para el medio de cultivo WP*1 el valor T es -5.281 con un valor de significancia menor a 0.05, por lo que se concluye que se rechaza la Hipótesis nula, es decir que existe evidencias suficientes para decir que existe diferencia en la longitud promedio del tallo cuando se aplica el medio de cultivo WP*1.

Para el medio de cultivo WP*2 el valor T es -10.390 con un valor de significancia menor a 0.05, por lo que se concluye que se rechaza la Hipótesis nula, es decir que

existe evidencias suficientes para decir que existe diferencia en la longitud promedio del tallo cuando se aplica el medio de cultivo WP*2.

Los resultados estadísticos muestran que el mejor medio de cultivo para el crecimiento de arándano en este proyecto fue el MS*2 ya que cuenta con la media más alta en longitud final del tallo con 2.60 y con diferencia significativa entre tratamientos; mientras que para número de hojas y nudos no hubo diferencia significativa entre tratamientos.



CONCLUSIONES

1. De los tratamientos aplicados a frutos con fermentación, etileno y temperatura baja 4°C, el que obtuvo mayor porcentaje de germinación fue la fermentación con 50% ($p < 0.05$) y de los tratamientos aplicados a semillas con AG₃, el mejor fue la concentración de 5 μM AG₃ con 55% ($p < 0.05$) de germinación. En cuanto al crecimiento *en vitro* de las plántulas obtenidas, se evidenció que el medio MS con concentraciones de 1/3 macronutrientes y doble de FeEDTA evidenció mejores resultados.

2. El tratamiento aplicado a frutos con mejor porcentaje germinación fue la fermentación con 50 % de germinación a las 18 semanas de evaluación, seguido del tratamiento temperatura fría a 4°C con 40 %, etileno y el control con 17.5 %. Además, tanto la fermentación como el tratamiento con temperatura fría cuentan con un porcentaje mayor de germinación al inicio de su evaluación, acortando el periodo de germinación del Arándano. Respecto a la emergencia, ninguno de los tratamientos presentó problemas en la emergencia de cotiledones, pero si en la aparición de hojas verdaderas, siendo la fermentación y temperatura fría los únicos en desarrollarlas. El análisis estadístico demuestra que si hay diferencia significativa entre tratamientos.

3. El tratamiento aplicado a semillas con mejor porcentaje germinación fue 5 μM AG₃ con 55% de germinación, seguido del tratamiento Control con un 18.3 %, 10 μM, 15 μM y 20 μM con 10 %. El hecho de que a menores concentraciones de AG₃ se encontraron mejores resultados, nos indica que a mayor concentración de AG₃ no necesariamente se obtendrá mayor porcentaje de germinación. Respecto a la emergencia, ninguno de los tratamientos presentó problemas ni en la emergencia de cotiledones, ni en el desarrollo de hojas verdaderas. El análisis estadístico demuestra que si hay diferencia significativa entre tratamientos.

4. La desinfección A con NaClO al 1.25 % presentó contaminación bacteriana en los tres tiempos evaluados. En la desinfección B con una concentración de NaClO de 2.5 %, no se evidenció ningún tipo de contaminación bacteriana.

5. El medio de cultivo con mejores resultados en crecimiento *in vitro* de *Vaccinium corymbosum* fue MS a 1/3 de macronutrientes con el doble de concentración de FeEDTA, mientras que para número de hojas y número de nudos los resultados fueron parecidos, no existiendo diferencia significativa entre tratamientos. En cuanto a la apariencia de las hojas *Vaccinium corymbosum* el medio de cultivo MS a 1/3 de macronutrientes con el doble de concentración de FeEDTA presentó mejor coloración. El análisis estadístico demuestra que solo hay diferencia significativa para la longitud del tallo de los explantes.



RECOMENDACIONES

1. Se recomienda hacer las pruebas de desinfestación en tubos de ensayo para así evitar la contaminación de las demás semillas y poder evaluar el desarrollo de cada semilla emergida. Además, probar con concentraciones menores de NaClO pero por más tiempos, para determinar la influencia del desinfectante en la viabilidad de las semillas y por lo tanto en su proceso de germinación.
2. Debido a que los resultados de germinación de tratamiento T3 (aplicado a fruto) y T2 (aplicado a semillas) obtuvieron los mejores resultados, además, estos fueron similares, podría realizarse futuros trabajos investigando si la combinación de estos dos tratamientos podría mejorar la tasa de germinación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Debnath SC. Improved shoot organogenesis from hypocotyl segments of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.). *Vitr Cell Dev Biol - Plant*. 2003;39(5):490–5.
2. Castro C, Olarte Y, Rache L, Pacheco J. Development of a germination protocol for blueberry seeds (*Vaccinium meridionale* Swartz). *Agron Colomb*. 2012;30(2):196–203.
3. Litwińczuk W, Szczerba G, Wrona D. Field performance of highbush blueberries (*Vaccinium* × *corymbosum* L.) cv. “Herbert” propagated by cuttings and tissue culture. *Sci Hortic (Amsterdam)*. 2005;106(2):162–9.
4. Meiners J, Schwab M, Szankowski I. Efficient in vitro regeneration systems for *Vaccinium* species. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 2007;89(2–3):169–76.
5. Basail Pérez M, Vega VM, De J, Caridad L, Martín V, Otero Gálvez E, et al. Multiplicación del clon de banano “FHIA-18” (AAAB) en Sistema de Inmersión Temporal Multiplication of banana clone “FHIA-18” (AAAB) in Temporary Immersion System. *Rev Colomb Biotecnol [Internet]*. 2012;XIV(1):8–19. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v14n1/v14n1a02.pdf>
6. Zurita-Valencia W, Gómez-Cruz J, Atrián-Mendoza E, Hernández-García A, Granados-García M, García-Magaña J, et al. Establecimiento de un método eficiente de germinación. *Polibotánica*. 2014;(38):129–44.
7. Paita M. Situación actual del cutivo del arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) en Huarmey. 2017;53.
8. Azevedo Pasqualini AP de, dos Santos JN, Ayub RA. Behavior and Viability of Blueberry Seeds through Germination and Tetrazolium Test. *Adv Biosci Biotechnol*. 2016;07(01):11–8.
9. Romero CA. El Arándano en el Perú y el mundo. *Minist Agric y Riego*. 2016;1:1–42.
10. Gamarra solorzano JE. Universidad Nacional Agraria La Molina Escuela De Posgrado. 2016;
11. Nesom G. Plant guide: Highbush Blueberry. *Plant Guid [Internet]*. 2001;

- Available from: https://plants.usda.gov/plantguide/pdf/pg_vaco.pdf
12. De Luca N. Características de las semillas, tratamientos pregerminativos, técnicas de recolección y almacenamiento. 2010;09. Available from: <https://cursoreforestacion.files.wordpress.com/2010/05/tecnicas-y-tratamientos-pregerminativos.pdf>
 13. Rost TL. Book Reviews. "Botany; a brief introduction to plant biology." *Ann Bot.* 2010;105(5):viii–viii.
 14. De valencia M, Ramirez F. Notas sobre la morfología, anatomía y germinación del Agraz. 1993;151–9.
 15. Pérez F. Germinación y Dormición de Semillas. In: *Material Vegetal de Reproducción; Manejo, Conservación y Tratamiento.* 2003. p. 177–200.
 16. ROCHA c. Neils. Efecto de la Escarificación Natural con agua a diferentes temperaturas y tiempos de inmersión, en la germinación de semillas de *Oenacarpus bataua* Mart. "Ungurahui", En Pucallpa. [Internet]. 2010. Available from: <https://docplayer.es/71895684-Universidad-nacional-de-ucayali.html>
 17. Olmos S, Galdeano E, Luciani G. Capítulo 1 Micropropagación. In: *Biotecnología y mejoramiento vegetal II* [Internet]. 2010. p. 650. Available from: https://www.researchgate.net/publication/304459382_IV_Capitulo_1_Micropropagacion
 18. Vazquez-Yanes C, Toledo JR. El almacenamiento de semillas en la conservación de especies vegetales. *Problemas y aplicaciones.* *Bot Sci.* 2019;69(49):61.
 19. María Isabel HP, Mario LA, Clara Inés MC, José Régulo CV. Andean blueberry (*Vaccinium Meridionale Swartz*) seed storage behaviour characterization under low temperature and conservation. *Rev Fac Nac Agron Medellín* [Internet]. 2012;65(2):6627–35. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-28472012000200007&lang=pt
 20. De la Cuadra C. Germinación, letancia y dormición de las semillas. *Intern Med.* 2011;50(10):1089–92.
 21. Shahram S. Seed dormancy and germination of *Vaccinium arctostaphylos* L.

- Int J Bot. 2007;3:307–3011.
22. In AD, Patients S. International Journal of Innovative Pharmaceutical Sciences and Research. Int J Appl Pharm Sci Res. 2014;2(2221):2221–9.
 23. Varela SA, Arana V. Latencia y germinación de semillas. Tratamientos pregerminativos. Sist For Integr [Internet]. 2011;3(1):250–8. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1202113>
 24. Dumroese RK, Jacobs DF, Wilkinson KM. Fases de cultivo: Establecimiento y crecimiento rápido. Prod plantas en viveros For. 2012;133–44.
 25. Roca W, Mroginski. L. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. 2554.
 26. Mrogironski. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro. In.
 27. Nath P, Trivedi PK, Sane VA, Sane AP. Role of ethylene in fruit ripening. Ethyl Action Plants. 2006;151–84.
 28. Buitrago Guacaneme CM, Rincón Soledad MC, Balaguera López HE, Ligarreto Moreno GA. Tipificación de Diferentes Estados de Madurez del Fruto de Agraz (*Vaccinium meridionale Swartz*). Rev Fac Nac Agron Medellín. 2015;68(1):7521–31.
 29. Jiménez-Bonilla V, Abdelnour-Esquivel A. Protocolo de micropropagación de arándano nativo de Costa Rica (*Vaccinium consanguinium*). Rev Tecnol en Marcha [Internet]. 2018;31(1):146. Available from: http://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/3504
 30. Torres M, Trujillo D, Arahana V. Cultivo in vitro del mortiño (*Vaccinium floribundum Kunth*). ACI Av en Ciencias e Ing. 2010;2(2).
 31. Donoso JM, Lemus S. G. Cima en frutales.Pdf. 2015. p. 22.
 32. Balaguera HE. Efecto de La Estratificación Fría y la Cobertura Plástica en Semillas de Gulupa (*Passiflora edulis Sims* .) para la Obtención de Plántulas.2010.
 33. Dweikat IM, Lyrene PM. Response of highbush blueberry seed germination to gibberellin A 3 and 6 N -benzyladenine . Can J Bot. 2011;67(11):3391–3.
 34. Magnitskiy S, Ligarret G. El efecto del nitrato de potasio, del ácido giberélico y de la ácido indolacético sobre la germinación de semillas de agraz (*Vaccinium meridionale Swartz*). Rev Colomb Ciencias Horti. 2007;1:137–41.

35. Pereira MJ. Conservation of *Vaccinium cylindraceum* Smith (Ericaceae) by micropropagation using seedling nodal explants. *Vitr Cell Dev Biol - Plant*. 2006;42(1):65–8.
36. Debnath SC. International Journal of Fruit Propagation of *Vaccinium* in Vitro. (2008):37–41.
37. Tetsumura T, Matsumoto Y, Sato M, Honsho C, Yamashita K, Komatsu H, et al. Evaluation of basal media for micropropagation of four highbush blueberry cultivars. *Sci Hortic (Amsterdam)*. 2008;119(1):72–4.
38. Rache Cardenal LY, Pacheco Maldonado JC. Propagación in vitro de plantas adultas de *Vaccinium meridionale* (Ericaceae). *Acta Bot Brasilica*. 2011;24(4):1086–95.
39. Undurraga, P., y Vargas, S. Manual del arándano. Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA, Centro Regional de Investigación Quilamapu, Chillán, Chile. Boletín INIA N° 263 (eds.) 2013. 120 p.



Tabla 1. Composición de medio de cultivo McCown Woody plant

	mg/L	PM (g/mol)	mM de WP
MACROELEMENTS			
1 Ammonium nitrate	400.000	80.05	5.00
2 Calcium chloride +2 H ₂ O	96.000	147.02	0.65
3 Calcium nitrate monohydrate +3H ₂ O	556.000	236.09	2.36
4 Magnesium sulphate +7H ₂ O	370.000	246.48	1.50
5 Potassium phosphate monobasic	170.000	136.09	1.25
6 Potassium sulphate	990.000	174.26	5.68
MICROELEMENTS			
	mg/L	PM	µM de WP
7 Boric acid	6.200	61.83	100.27
8 Copper sulphate pentahydrate	0.250	249.68	1.00
9 EDTA disodium salt dihydrate	37.300	374.23	99.67
10 Ferrous sulphate heptahydrate	27.800	278	100.00
11 Manganese sulphate monohydrate	22.300	169.62	131.47
12 Molybdic acid (sodium salt)	0.250	241.95	1.033
13 Zinc sulphate heptahydrate	8.600	287.543	29.91
VITAMINS			
	mg/L	PM	µM de WP
14 myo-Inositol	100.000	180.16	555.06
15 Nicotinic acid (free acid)	0.500	123.11	4.06
16 Pyridoxine HCl	0.500	205.64	2.43
17 Thiamine hydrochloride	1.000	337.27	2.96
18 ácido ascórbico	2.000	176.13	11.36
AMINO ACID			
	mg/L	PM	µM de WP
19 Glycine	2.000	75.07	26.64
REGULADORES DE CRECIMIENTO			
	mg/L	PM	µM de WP
20 ANA		186.21	0.50
21 BAP		225.25	2.00

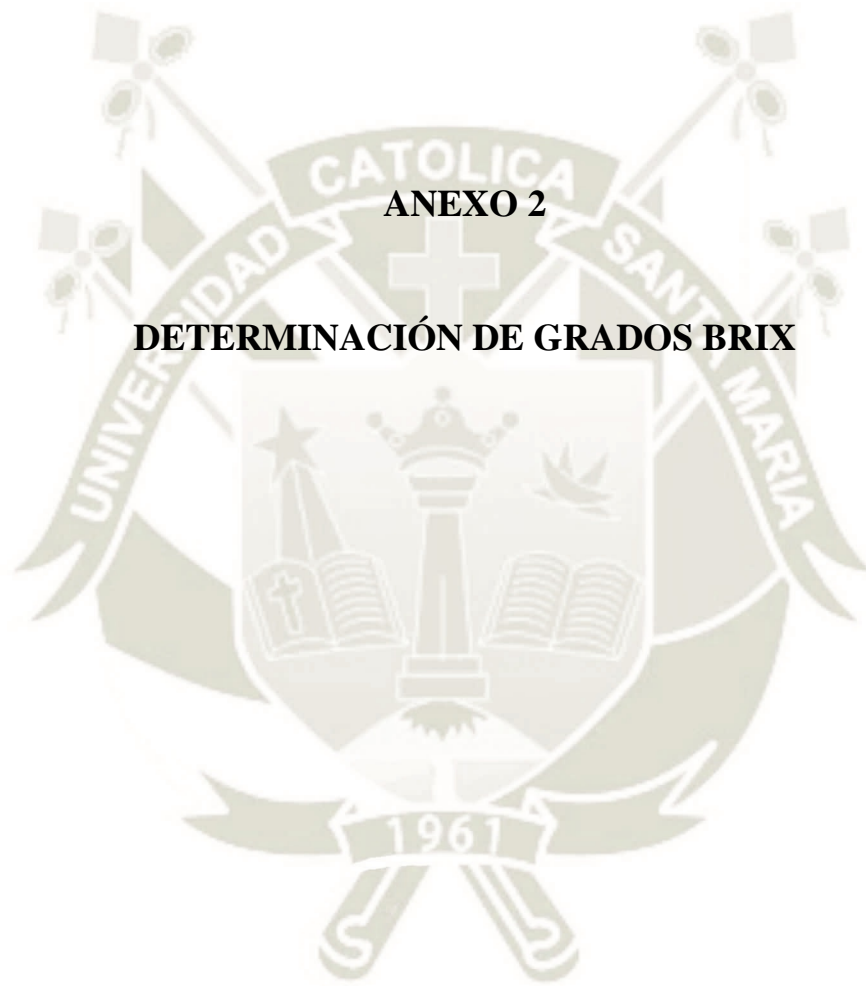
Tabla 2. Composición de medio de cultivo Murashigue & Skoog

	mg/L	PM	mM
MACROELEMENTOS			
1 Ammonium nitrate	1650.000	80.05	20.61
2 Calcium chloride	440.000	146.986	2.99
3 Nitrato de potasio	1900.000	101.1	18.79
4 Magnesium sulphate	370.000	246.48	1.50
5 Potassium phosphate monobasic	170.000	136.09	1.25
MICROELEMENTOS			
		PM	µM

6	Boric acid	6.200	61.83	100.27
7	Copper sulphate pentahydrate	0.025	249.68	0.10
8	EDTA disodium salt dihydrate	37.300	374.23	99.67
9	Ferrous sulphate heptahydrate	27.800	278	100.00
10	Sulfato de manganeso 4H ₂ O	22.300	223.001	100.00
11	Ioduro de potasio	0.830	166.0028	5.00
12	molibdate de sodio	0.250	241.95	1.03
13	cloruro de cobalto 6H ₂ O	0.025	237.93	0.11
14	Zinc sulphate heptahydrate	8.600	287.543	29.91
	VITAMINAS		PM	µM
15	myo-Inositol	100.000	180.16	555.06
16	Nicotinic acid (free acid)	0.500	123.11	4.06
17	Pyridoxine HCl	0.500	205.64	2.43
18	Thiamine hydrochloride	0.100	337.27	0.30
	AMINOACIDO		PM	µM
19	Glycine	2.000	75.07	26.64
	REGULADORES DE CRECIMIENTO	mg/L	PM	µM
20	ANA		186.21	0.50
21	BAP		225.25	2.00

ANEXO 2

DETERMINACIÓN DE GRADOS BRIX



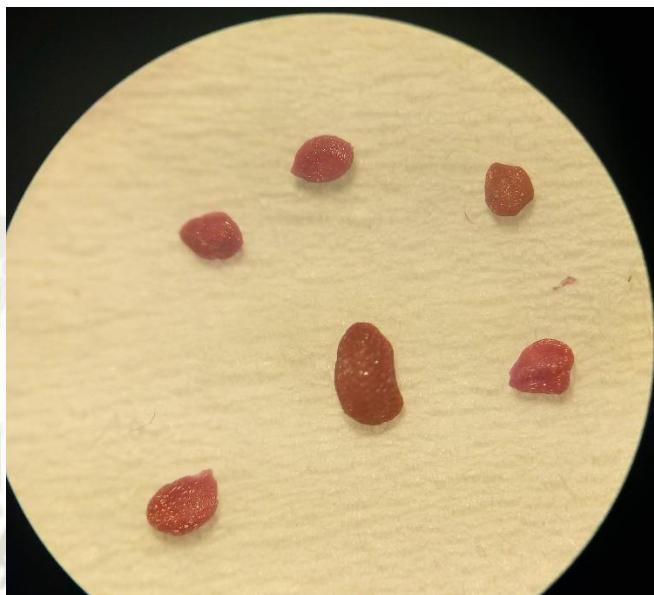


Figura 1. Vista al esterescopio de las semillas obtenidas de tratamiento pregerminativo 3 (fermentación)



Figura 2. Determinación de grados Brix en refractómetro

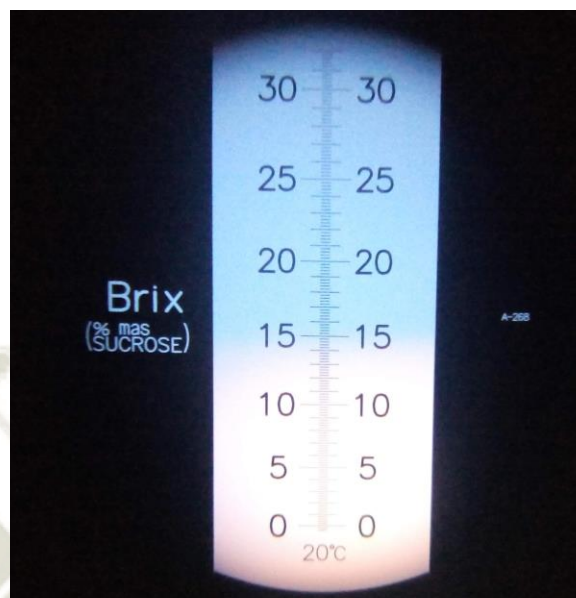


Figura 3. Grados Brix obtenidos de fruto fermentado



ANEXO 3

Tabla 1. Número y Porcentaje de semillas de *Vaccinium corymbosum* (Arándano) germinadas, con 3 repeticiones por tratamiento aplicados a frutos. (T1: maduración del fruto al ambiente), T2: maduración del fruto con etileno, T3: maduración del fruto en fermentación y T4: frutos tratados con frío) hasta la semana 18

		EVALUACION SEMANAL														
Tratamientos		4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
T1	r1	0	0	0	1	3	4	4	4	5	5	5	6	7	7	7
	r2	0	0	0	0	4	4	4	6	8	8	8	8	8	8	8
	r3	0	0	1	1	3	3	3	4	5	5	6	6	6	6	6
	\bar{x}	0.0	0.0	0.3	0.7	3.3	3.7	3.7	4.7	6.0	6.0	6.3	6.7	7.0	7.0	7.0
	%	0.0	0.0	0.8	1.7	8.3	9.2	9.2	11.7	15.0	15.0	15.8	16.7	17.5	17.5	17.5
T2	r1	0	1	1	1	1	4	4	4	7	8	8	8	8	8	8
	r2	0	0	0	0	0	0	1	3	6	6	7	7	7	7	7
	r3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	6	6	6	6
	\bar{x}	0	0.3	0.3	0.3	0.3	1.3	1.7	2.3	4.3	4.7	7	7	7	7	7
	%	0	0.8	0.8	0.8	0.8	3.3	4.2	5.8	10.8	11.7	17.5	17.5	17.5	17.5	17.5
T3	r1	8	11	14	14	17	17	17	20	20	23	23	23	23	23	23
	r2	8	9	11	14	14	17	17	19	19	19	19	20	21	21	21
	r3	7	9	10	13	13	13	13	14	14	14	14	16	16	16	16
	\bar{x}	7.7	9.7	11.7	13.7	14.7	15.7	15.7	17.7	17.7	18.7	18.7	19.7	20	20	20
	%	19.2	24.2	29.2	34.2	36.7	39.2	39.2	44.2	44.2	46.7	46.7	49.2	50	50	50
T4	r1	6	6	8	10	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	14
	r2	5	8	8	9	11	11	14	16	16	16	16	16	16	16	16
	r3	8	8	8	9	11	13	13	16	16	16	17	17	17	17	18
	\bar{x}	6.33	7.33	8	9.33	11.3	12	13	14.7	14.7	14.7	15	15	15	15	16
	%	15.8	18.3	20	23.3	28.3	30	32.5	36.7	36.7	36.7	37.5	37.5	37.5	37.5	40

T_{s4}	r1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	3	3	3	3	3
	r2	0	0	0	0	0	3	3	3	3	3	3	3	5	5	5	5
	r3	0	0	0	0	0	0	1	1	2	3	3	5	5	5	5	5
	\bar{x}	0	0	0	0	0	1.0	1.3	1.7	2.0	2.3	2.3	3.7	4.3	4.3	4.3	4.3
	%	0	0	0	0	0	2.5	3.3	4.2	5.0	5.8	5.8	9.2	10.8	10.8	10.8	10.8
T_{s5}	r1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	2	3	3	3	3
	r2	0	0	0	0	1	3	4	4	4	5	6	6	6	6	6	6
	r3	0	0	0	0	0	1	1	1	1	3	3	3	3	3	3	3
	\bar{x}	0	0	0	0	0.3	1.3	1.7	2	2	3	3.7	3.7	4	4	4	4
	%	0	0	0	0	0.8	3.3	4.2	5.0	5.0	7.5	9.2	9.2	10	10	10	10

ANEXO 5

Tabla 3. Número y Porcentaje de emergencia de semillas con cotiledones de Vaccinium corymbosum (Arándano) con 3 repeticiones por tratamiento aplicado a frutos. (T1: maduración del fruto al ambiente), T2: maduración del fruto con etileno, T3: maduración del fruto en macerado y T4: frutos tratados con frio) hasta la semana 18

TRATAMIENTOS		EVALUACION SEMANAL								
		10	11	12	13	14	15	16	17	18
T1	r1	0	2	2	2	2	2	2	2	2
	r2	1	3	4	4	4	4	4	4	4
	r3	0	2	2	2	2	3	3	3	3
	\bar{x}	0	2	3	3	3	3	3	3	3
	%	9	64	73	73	82	82	82	82	82
T2	r1	0	1	2	3	3	3	4	4	4
	r2	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	r3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	\bar{x}	0	1	2	2	2	2	3	3	3
	%	0	27	41	54	54	54	68	68	68
T3	r1	13	15	17	17	17	17	17	17	17
	r2	15	16	16	16	16	16	16	16	16
	r3	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	\bar{x}	13	14	14	14	14	14	14	14	14
	%	81	87	91	91	91	91	91	91	91
T4	r1	9	9	9	10	10	10	10	10	10
	r2	9	10	11	11	11	11	11	11	11
	r3	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	\bar{x}	9	10	10	10	10	10	10	10	10
	%	72	74	77	79	79	79	79	79	79

ANEXO 6

Tabla 4. Número y porcentaje de semillas emergidas de *Vaccinium corymbosum* (Arándano) con hojas verdadera con tres repeticiones. T1: maduración del fruto al ambiente), T2: maduración del fruto con etileno, T3: maduración del fruto en macerado y T4: frutos tratados con frío) hasta la semana 18.

		EVALUACION SEMANAL								
TRATAMIENTOS		10	11	12	13	14	15	16	17	18
T1	r1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	r2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	r3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	\bar{X}	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	%	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T2	r1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	r2	0	0	1	1	1	1	1	1	1
	r3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	\bar{X}	0	0	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
	%	0	0	9	9	9	9	9	9	9
T3	r1	3	5	7	9	11	11	13	13	14
	r2	5	8	14	16	16	16	16	16	16
	r3	7	8	9	10	10	11	12	12	13
	\bar{X}	5	7	10	12	13	13	14	14	14
	%	33	46	66	80	84	86	91	91	95
T4	r1	0	0	0	1	2	4	4	4	4
	r2	1	2	3	3	6	7	7	7	7
	r3	0	3	4	4	7	7	7	7	7
	\bar{X}	0.3	2	2	3	5	6	6	6	6
	%	2.6	13	18	21	38	46	46	46	46

ANEXO 7

Tabla 5. Número y Porcentaje de semillas emergidas con nudos de *Vaccinium corymbosum* (Arándano) con 3 repeticiones por tratamiento aplicado a frutos. (T1: maduración del fruto al ambiente), T2: maduración del fruto con etileno, T3: maduración del fruto en macerado y T4: frutos tratados con frío) hasta la semana 18

TRATAMIENTOS		EVALUACION SEMANAL								
		10	11	12	13	14	15	16	17	18
T1	r1	0	2	2	2	2	2	2	2	2
	r2	1	3	4	4	4	4	4	4	4
	r3	0	2	2	2	2	3	3	3	3
	\bar{X}	0	2	3	3	3	3	3	3	3
	%	9	64	73	73	82	82	82	82	82
T2	r1	0	1	2	3	3	3	4	4	4
	r2	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	r3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	\bar{X}	0	1	2	2	2	2	3	3	3
	%	0	27	41	54	54	54	68	68	68
T3	r1	13	15	17	17	17	17	17	17	17
	r2	15	16	16	16	16	16	16	16	16
	r3	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	\bar{X}	13	14	14	14	14	14	14	14	14
	%	81	87	91	91	91	91	91	91	91
T4	r1	9	9	9	10	10	10	10	10	10
	r2	9	10	11	11	11	11	11	11	11
	r3	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	\bar{X}	9	10	10	10	10	10	10	10	10
	%	72	74	77	79	79	79	79	79	79

ANEXO 8

Tabla 6. Tamaño de semillas emergidas de *Vaccinium corymbosum* (Arándano), con 3 repeticiones por tratamiento aplicado a frutos. (T1: maduración del fruto al ambiente), T2: maduración del fruto con etileno, T3: maduración del fruto en macerado y T4 frutos tratados con frío) hasta la semana 18. Datos en mm.

		TRATAMIENTOS								
		10	11	12	13	14	15	16	17	18
T1	r1	2	2	3	2	3	2	3	3	3
	r2	2	2	3	3	3	3	4	4	4
	r3	1	2	2	2	3	3	4	4	4
	prom	2	2	2	2	3	3	4	4	4
T2	r1	2	2	2	3	3	3	4	4	4
	r2	1	1	2	2	3	3	3	3	3
	r3	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	prom	1	1	2	2	2	2	3	3	3
T3	r1	8	8	9	10	10	10	10	11	12
	r2	11	13	13	14	15	15	16	16	16
	r3	11	11	11	11	12	12	12	12	13
	prom	10	10	11	12	12	12	13	13	14
T4	r1	3	3	5	7	8	10	12	13	13
	r2	3	3	5	6	7	9	11	12	12
	r3	4	4	5	7	8	9	10	12	13
	prom	3	4	5	6	8	9	11	12	12

ANEXO 9

Tabla 7. Número y Porcentaje de emergencia de semillas de *Vaccinium corymbosum* (Arándano), con 3 repeticiones por tratamiento aplicado a semillas. (T_s1 : control, T_s2 : semillas con 5 μM AG3, T_s3 semillas con 10 μM AG3, T_s4 : semillas con 15 μM AG3 y T_s5 : semillas con 20 μM AG3)) hasta la semana 18.

TRATAMIENTO	EVALUACIONES SEMANALES									
		10	11	12	13	14	15	16	17	18
0AG3	r1	1	1	2	3	4	4	4	4	4
	r2	0	1	3	4	4	4	4	4	4
	r3	1	2	3	3	3	3	3	3	3
	\bar{x}	1	1	3	3	4	4	4	4	4
	%	17	33	67	83	92	92	92	92	92
5AG3	r1	0	0	3	10	14	14	14	14	14
	r2	0	1	7	9	14	14	14	14	14
	r3	1	1	2	2	6	9	9	9	9
	\bar{x}	0	1	4	7	11	12	12	12	12
	%	3	5	31	54	87	95	95	95	95
10AG3	r1	1	1	1	2	2	2	2	2	2
	r2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	r3	0	0	0	0	1	1	1	1	1
	\bar{x}	0	0	0	1	1	1	1	1	1
	%	33	33	33	67	100	100	100	100	100
15AG3	r1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
	r2	0	1	2	2	3	3	3	3	3
	r3	0	0	0	0	1	1	1	1	1
	\bar{x}	0	0	1	1	2	2	2	2	2
	%	0	17	33	50	83	83	83	83	83
20AG3	r1	0	0	0	1	1	2	2	2	2
	r2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	r3	0	0	1	1	1	1	1	1	1
	\bar{x}	1	1	1	1	1	2	2	2	2
	%	33	33	50	67	67	83	83	83	83

ANEXO 10

Tabla 8. Número y Porcentaje de semillas emergidas de *Vaccinium corymbosum* (Arándano) con hojas verdaderas, con 3 repeticiones por tratamiento aplicado a semillas. (T_s1 : control, T_s2 : semillas con 5 μM AG3, T_s3 semillas con 10 μM AG3, T_s4 . semillas con 15 μM AG3 y T_s5 : semillas con 20 μM AG3) hasta la semana 18.

Tratamientos	Repeticiones	EVALUACIONES SEMANALES								
		10	11	12	13	14	15	16	17	18
0AG3	r1	0	0	0	1	1	2	3	3	3
	r2	0	0	0	0	0	0	2	3	3
	r3	0	0	1	1	1	2	3	3	3
	\bar{x}	0	0	0	1	1	1	3	3	3
	%	0	0	8.3	17	17	33	67	75	75
5AG3	r1	1	1	1	1	1	2	2	6	9
	r2	1	1	1	1	1	1	2	7	10
	r3	1	1	1	2	2	3	3	4	8
	\bar{x}	1	1	1	1	1	2	2	6	9
	%	8	8	8	10	10	15	18	44	69
10AG3	r1	0	0	0	0	1	1	1	2	2
	r2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	r3	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	\bar{x}	0	0	0	0	0	0	0	1	1
	%	0	0	0	0	33	33	33	100	100
15AG3	r1	0	0	0	0	0	1	1	1	1
	r2	0	0	0	0	0	0	1	1	1
	r3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	\bar{x}	0	0	0	0	0	0	1	1	1
	%	0	0	0	0	0	17	33	33	33
20AG3	r1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	r2	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	r3	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	\bar{x}	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	%	0	0	0	0	0	0	0	0	33

ANEXO 11

Tabla 9. Número y Porcentaje de semillas emergidas con nudos, de *Vaccinium corymbosum* (Arándano), con 3 repeticiones por tratamiento aplicado a semillas. (T_s1: control, T_s2: semillas con 5 μ M AG3, T_s3 semillas con 10 μ M AG3, T_s4: semillas con 15 μ M AG3 y T_s5: semillas con 20 μ M AG3) hasta la semana 18.

		EVALUACIONES SEMANALES									
Tratamiento	Repeticiones	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
0AG3	r1	1	1	2	3	4	4	4	4	4	
	r2	0	1	3	4	4	4	4	4	4	
	r3	1	2	3	3	3	3	3	3	3	
	\bar{x}	1	1	3	3	4	4	4	4	4	
	%	18	36	72	90	99	99	99	99	99	
5AG3	r1	0	0	3	10	14	14	14	14	14	
	r2	0	1	7	9	14	14	14	14	14	
	r3	1	1	2	2	6	9	9	9	9	
	\bar{x}	0	1	4	7	11	12	12	12	12	
	%	3	5	30	53	85	93	93	93	93	
10AG3	r1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	
	r2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	r3	0	0	0	0	1	1	1	1	1	
	\bar{x}	0	0	0	1	1	1	1	1	1	
	%	33	33	33	67	100	100	100	100	100	
15AG3	r1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	
	r2	0	1	2	2	3	3	3	3	3	
	r3	0	0	0	0	1	1	1	1	1	
	\bar{x}	0	0	1	1	2	2	2	2	2	
	%	0	20	39	59	98	98	98	98	98	
20AG3	r1	0	0	0	1	1	2	2	2	2	
	r2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
	r3	0	0	1	1	1	1	1	1	1	
	\bar{x}	1	1	1	1	1	2	2	2	2	
	%	33	33	50	67	67	83	83	83	83	

ANEXO 12

Tabla 10. Tamaño de plántulas de *Vaccinium corymbosum* (Arándano) con 3 repeticiones por tratamiento aplicado a semillas. (T_s1 : control, T_s2 : semillas con 5 μM AG3, T_s3 semillas con 10 μM AG3, T_s4 : semillas con 15 μM AG3 y T_s5 : semillas con 20 μM AG3) hasta la semana 18. Datos en mm.

Tratamientos	Repeticiones	EVALUACIONES SEMANALES								
		10	11	12	13	14	15	16	17	18
T_s1	r1	2	4	5	7	9	8	9	10	14
	r2	4	3	4	4	7	8	10	11	12
	r3	3	3	3	5	5	6	7	8	9
	prom	3	3	4	9	7	7	9	10	11
T_s2	r1	2	3	3	4	4	5	6	7	8
	r2	4	4	5	5	6	7	6	7	8
	r3	3	2	3	4	5	6	6	7	8
	prom	3	3	4	4	5	6	6	7	8
T_s3	r1	5	5	8	8	9	11	14	17	20
	r2	2	2	2	2	3	3	3	4	4
	r3	2	4	3	4	5	4	5	7	6
	prom	3	4	4	4	6	6	8	9	10
T_s4	r1	0	0	0	10	3	7	13	13	17
	r2	0	3	7	7	10	8	8	10	14
	r3	0	0	0	0	2	2	8	8	12
	prom	0	1	2	6	5	6	10	10	14
T_s5	r1	0	0	0	5	5	7	7	7	7
	r2	5	5	4	3	3	3	3	3	3
	r3	0	0	3	3	3	3	3	3	3
	prom	2	2	2	4	4	4	4	4	4



ANEXO 13

RESULTADOS DE CONTAMINACIÓN

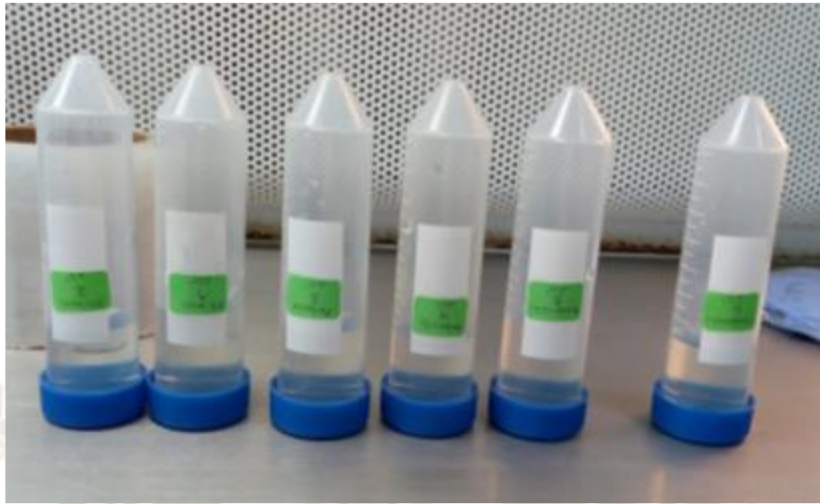


Figura 1. Tubos Falcon con NaClO para desinfección, dentro de la cámara de flujo laminar

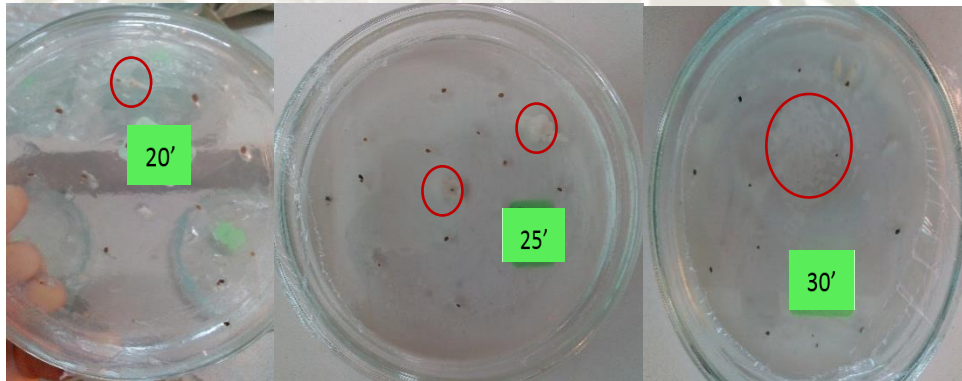


Figura 2. Desinfección A (20, 25 y 30 min de izquierda a derecha) de las semillas provenientes de tratamiento pregerminativo 1.

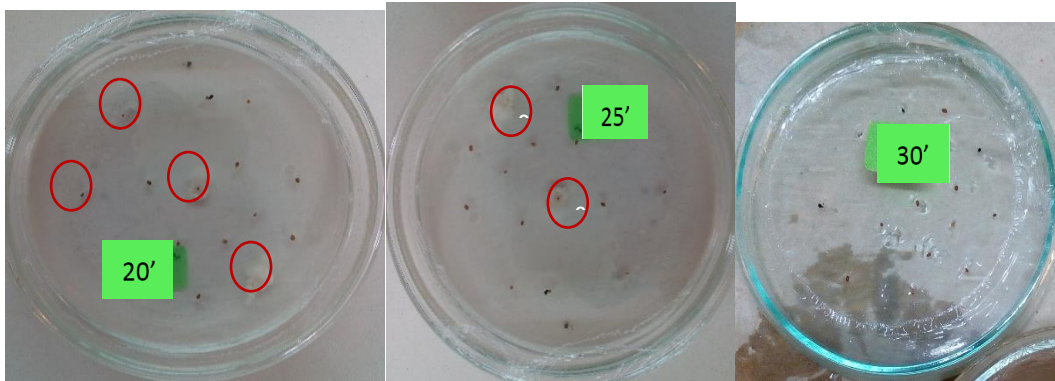


Figura 3. Desinfestación A (20, 25 y 30 min de izquierda a derecha) de las semillas provenientes de tratamiento pregerminativo 2.

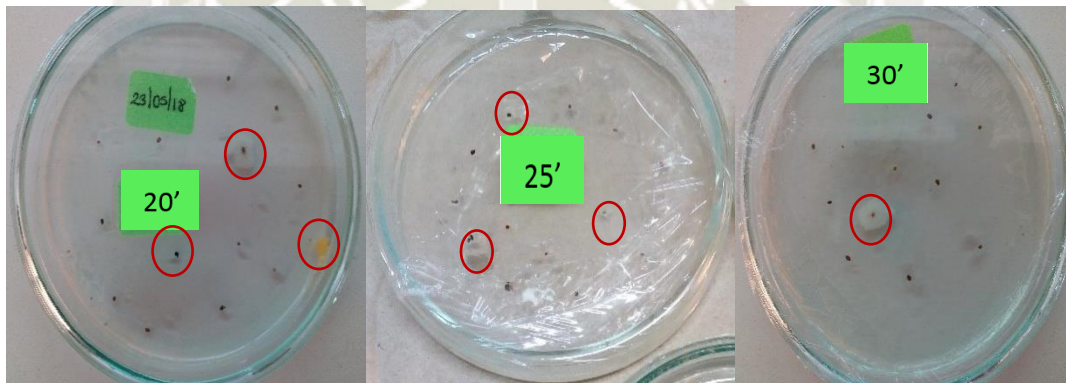


Figura 4. Desinfestación A (20, 25 y 30 min de izquierda a derecha) de las semillas provenientes de tratamiento pregerminativo 3.



Figura 5. Desinfestación B.

Tabla 1. Número de semillas contaminadas por hongos en el tratamiento A de desinfestación

Tratamiento desinfestación A									
Tratamiento	Ambiente			Etileno			Macerado		
Tiempo min.	20	25	30	20	25	30	20	25	30
Repetición 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Repetición 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Repetición 3	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Promedio	0	0	0	0	0	0	0.3	0	0
Porcentaje de contaminación %	0	0	0	0	0	0	3	0	0

Tabla 2. Número y porcentaje promedio de semillas contaminadas por bacterias en los tratamientos de desinfección A y B

Tratamiento de semillas en tres tiempos (min) de inmersión en NaClO 1.25 %													
Tratamiento A	Ambiente (min)			Etileno (min)			Fermentado (min)			□20	□25	□30	□Total
	20	25	30	20	25	30	20	25	30				
R1	2	0	1	4	2	0	3	3	1				
R2	1	2	2	1	2	1	2	1	1				
R3	2	2	0	2	1	1	0	0	1				
Promedio	1.7	1.3	1	2.3	1.7	1	2	1	1	2	1	1	1
Contaminación %	17	13	10	23	17	7	17	13	10				
\bar{x} por pretratamiento	13.3			15.67			13.3						
Tratamiento de semillas en tres tiempos (min) de inmersión en NaClO 2.50 %													
Tratamiento B	Ambiente (min)			Etileno (min)			Fermentado (min)			□20	□25	□30	□Total
	20	25	30	20	25	30	20	25	30				
R1	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
R2	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
R3	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
Promedio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Contaminación %	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
\bar{x} por pretratamiento	0			0			0						



ANEXO 14

RESULTADOS DE CRECIMIENTO EN MEDIOS MS Y WP

NÚMERO DE HOJAS

Tabla 1. Número de hojas promedio por tratamiento (medio de cultivo) hasta la décima semana. MS: murashige & skoog 1982 con macroelementos a 1/3 de la concentración original. WP: woody plant, lloyd & brent 1981).

Medio MS*1											
		Semanas									
Repeticiones	Plántulas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
R1	1	4	4	5	6	6	7	7	8	8	9
	2	4	5	6	6	7	7	8	8	8	8
	3	4	5	5	5	5	5	5	6	6	7
	4	4	4	6	6	7	7	8	8	8	8
	5	4	4	5	5	6	6	6	7	7	7
Promedio		4	4	5	6	6	6	7	7	7	8
R2	1	3	3	3	4	4	4	5	5	6	6
	2	3	4	4	5	5	6	6	6	7	7
	3	3	4	5	5	5	5	6	6	7	7
	4	4	5	6	6	7	7	7	8	9	9
	5	2	3	3	4	5	6	6	7	7	7
Promedio		3	3.8	4.2	4.8	5.2	5.6	6	6.4	7.2	7.2
R3	1	4	4	5	5	6	6	6	7	7	8
	2	2	4	5	6	7	7	7	7	7	7
	3	3	4	4	4	5	5	6	6	7	7
	4	4	5	6	6	7	7	7	8	9	9
	5	3	3	4	4	5	5	5	6	6	6
Promedio		3.2	4	4.8	5	6	6	6.2	6.8	7.2	7.4
Medio MS*2											
		Semanas									
Repeticiones	Plántulas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
R1	1	3	4	4	5	5	6	6	7	7	8
	2	4	4	5	5	5	6	7	7	8	8
	3	2	4	5	6	6	7	7	8	8	9
	4	4	4	5	6	6	6	7	7	7	8
	5	3	3	4	4	5	5	5	6	6	7
Promedio		3	4	5	5	5	6	6	7	7	8
R2	1	3	5	6	6	7	7	8	8	8	8
	2	2	4	4	5	5	6	6	6	7	7
	3	3	4	4	4	5	5	6	6	7	7
	4	3	3	4	4	4	5	5	6	6	7

		5	4	5	5	6	6	7	7	8	8	8
Promedio			3	4.2	4.6	5	5.6	6	6.6	6.8	7.4	7.4
R3	1	4	5	6	6	6	7	7	8	8	9	
	2	2	4	4	5	5	5	6	6	7	7	
	3	4	5	7	7	8	9	9	11	11	12	
	4	3	4	5	5	6	6	7	7	8	8	
	5	3	5	7	8	8	9	10	10	11	12	
Promedio		3.2	4.6	5.8	6.2	6.6	7.2	7.8	8.4	9	9.6	
Medio WP*1												
		Semanas										
Repeticiones	Plántulas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
R1	1	2	3	3	4	4	5	5	6	7	8	
	2	2	4	4	4	4	4	5	5	5	5	
	3	2	2	4	5	6	6	7	8	8	9	
	4	3	4	4	6	6	7	7	7	7	7	
	5	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
Promedio		2	3	3	4	4	5	5	6	6	6	
R2	1	4	4	5	6	6	7	8	8	9	9	
	2	3	5	5	5	5	6	6	7	7	8	
	4	5	5	5	6	6	7	8	8	9	9	
	5	2	3	3	4	4	4	5	5	5	5	
Promedio		3.5	4.25	4.5	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	5.25	
R3	1	4	5	6	7	7	7	8	8	8		
	2	3	4	4	6	7	8	9	10	11	12	
	3	3	4	4	4	5	6	6	7	7	7	
	4	3	4	4	4	5	6	6	7	7	8	
	5	4	5	5	6	7	7	7	8	8	9	
Promedio		3.4	4.4	4.6	5.4	6.2	6.8	7	8	8.2	8.8	
Medio WP*2												
		Semanas										
Repeticiones	Plántulas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
R1	1	3	5	5	6	6	6	7	7	8	8	
	2	3	4	4	5	5	5	6	6	6	6	
	3	4	5	5	6	6	7	7	8	8	8	
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	5	2	4	4	5	5	6	6	7	7	7	
Promedio		3	5	5	6	6	6	7	7	7	7	
R2	1	4	6	6	6	7	7	7	7	7	7	

	2	4	4	5	5	5	6	6	7	7	8
	3	2	2	2	3	3	3	3	4	4	4
	4	4	5	6	6	6	6	6	7	7	7
	5	3	4	4	4	5	5	6	6	7	7
Promedio		3.4	4.2	4.6	4.8	5.2	5.4	5.6	6.2	6.4	6.6
R3	1	2	2	2	3	3	3	3	4	4	4
	2	4	4	4	5	5	5	5	6	6	7
	3	4	5	5	5	6	6	6	7	7	8
	4	2	2	2	3	3	4	4	5	5	5
	5	4	5	5	6	6	6	7	7	7	8
Promedio		3.2	3.6	3.6	4.4	4.6	4.8	5	5.8	5.8	6.4





ANEXO 15

RESULTADOS DE CRECIMIENTO EN MEDIOS MS Y WP

NUMERO DE NUDOS

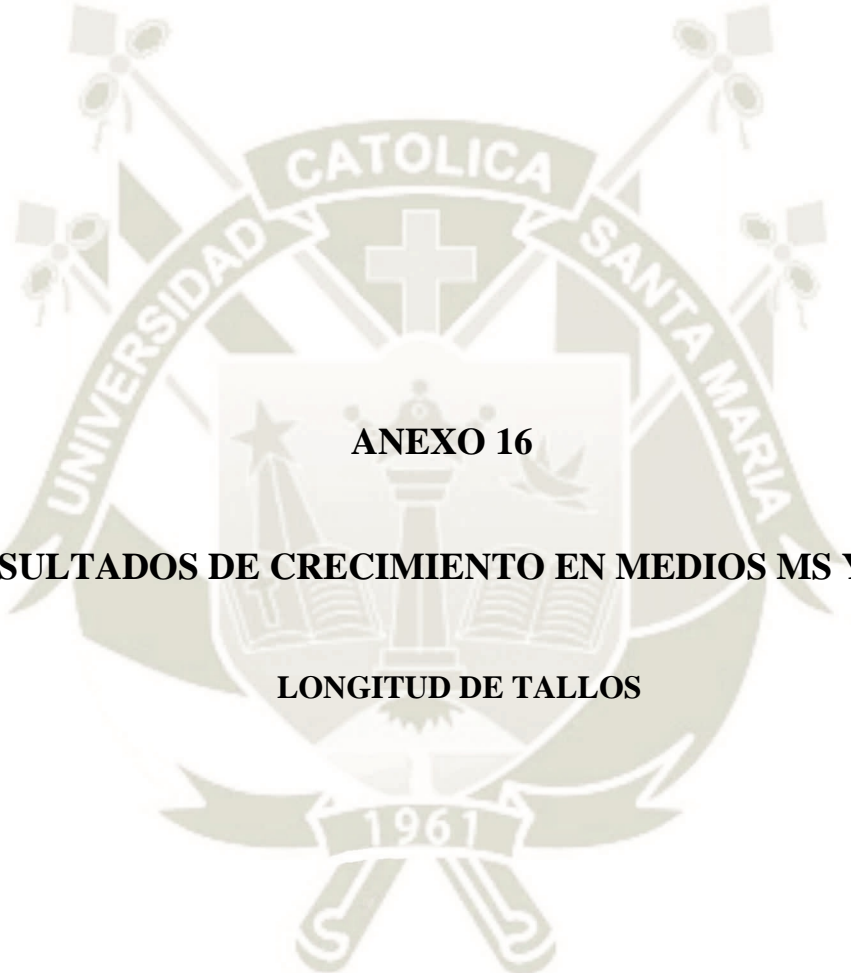
Tabla 1. Número promedio de nudos por repetición por tratamiento hasta la sexta semana. MS: Murashige & Skoog 1982), MS/3: MS con macroelementos a 1/3 de la concentración original. WP: Woody Plant, Lloyd & Brent 1981).

		MS*1									
		Semanas									
	Repetición de Plántula	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
R1	1	2	2	2	3	3	5	5	6	6	7
	2	2	2	3	4	5	5	6	6	6	6
	3	2	2	2	3	3	4	4	4	4	5
	4	2	2	3	4	5	5	6	6	6	6
	5	2	2	2	3	4	4	4	5	5	5
	PROM	2	2	2	3	4	5	5	5	5	6
R2	1	1	2	2	2	2	2	3	3	4	4
	2	1	2	2	3	3	4	4	4	5	5
	3	2	2	2	3	3	3	4	4	5	5
	4	2	3	3	4	5	5	5	6	7	7
	5	1	1	2	3	3	4	4	5	5	5
	PROM	1.4	2	2.2	3	3.2	3.6	4	4.4	5.2	5.2
R3	1	2	2	3	3	4	4	4	5	5	6
	2	1	1	2	3	4	5	5	5	5	5
	3	2	2	3	4	3	3	4	4	5	5
	4	2	2	3	4	5	5	5	6	7	7
	5	1	1	2	2	3	3	3	3	4	4
	PROM	1.6	1.6	2.6	3.2	3.8	4	4.2	4.6	5.2	5.4
		MS*2									
	Repetición de Plántula	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
R1	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6
	2	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6
	3	1	2	3	4	5	5	5	6	6	7
	4	2	2	3	3	4	4	5	5	5	6
	5	1	2	2	3	3	3	3	4	4	5
	PROM	1	2	3	3	4	4	4	5	5	6
R2	1	1	2	3	4	5	5	6	6	6	6
	2	1	2	2	3	3	4	4	4	5	5
	3	2	2	3	3	3	3	3	4	5	5
	4	1	2	2	2	2	3	4	4	5	5
	5	2	2	3	4	5	5	5	6	6	6

	PROM	1.4	2	2.6	3.2	3.6	4	4.4	4.8	5.4	5.4
R3	1	2	2	3	4	5	5	5	6	6	7
	2	1	2	2	3	3	3	4	4	5	5
	3	2	2	3	4	5	7	7	9	9	9
	4	1	2	3	3	4	4	5	5	6	6
	5	2	2	4	6	7	6	8	8	9	10
	PROM	1.6	2	3	4	4.8	5	5.8	6.4	7	7.4
		WP*1									
	Repetición de Plántula	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
R1	1	1	2	2	2	2	3	3	4	5	6
	2	1	2	2	2	2	2	3	3	3	3
	3	1	1	2	4	4	4	5	6	6	7
	4	1	2	3	4	4	5	5	5	5	5
	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	PROM	1	2	2	3	3	3	3	4	4	4
R2	1	2	2	3	4	4	5	6	6	7	7
	2	1	2	3	4	3	4	4	5	5	6
	4	2	2	2	3	4	5	6	6	7	7
	5	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3
	PROM	1.5	1.75	2.5	3.25	3.25	4	4.75	5	5.5	5.75
R3	1	2	2	3	5	5	5	5	6	6	6
	2	1	2	2	3	5	6	7	8	9	10
	3	1	1	2	2	3	4	4	5	5	5
	4	1	1	2	2	3	4	4	5	5	5
	5	2	2	3	4	5	5	5	6	6	7
	PROM	1.4	1.6	2.4	3.2	4.2	4.8	5	6	6.2	6.6
		WP*2									
	Repetición de Plántula	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
R1	1	2	2	2	3	3	4	5	5	6	6
	2	1	2	2	3	3	3	4	4	4	4
	3	2	2	3	4	4	5	5	6	6	6
	5	1	2	2	2	2	4	4	5	5	5
	PROM	2	2	2	3	3	4	5	5	5	5
R2	1	2	3	3	3	5	5	5	5	5	5
	2	2	2	3	3	3	4	4	5	5	6
	3	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2
	4	2	2	3	4	4	4	4	5	5	5

	5	1	2	2	2	3	3	4	4	5	5
	PROM	1.6	2	2.4	2.8	3.4	3.6	3.8	4.2	4.4	4.6
R3	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2
	2	2	2	3	3	3	3	3	4	4	5
	3	2	2	3	3	3	4	4	5	5	6
	4	1	1	1	1	1	2	2	3	3	3
	5	2	2	3	3	3	4	5	5	5	6
	PROM	1.6	1.6	2.2	2.4	2.4	3	3.2	3.8	3.8	4.4





ANEXO 16

RESULTADOS DE CRECIMIENTO EN MEDIOS MS Y WP

LONGITUD DE TALLOS

Tabla 1. Longitud promedio de tallos al inicio y al final de su cultivo in vitro (10 semanas) en medios MS y WP. MS: Murashige & Skoog 19862), MS: MS con macroelementos a 1/3 de la concentración original. WP: Woody Plant, Lloyd & Brent 1980). Datos en mm.

		MS*1			MS*2			WP*1			WP*2		
	Plántulas	Hi	Hf	DIFERENCIA	Hi	Hf	DIFERENCIA	Hi	Hf	DIFERENCIA	Hi	Hf	DIFERENCIA
R1	1	1	2.5	1.5	1.3	2	0.7	1	2	1	1	2.5	1.5
	2	1	2	1	1	2.3	1.3	1	2	1	1.3	2.2	0.9
	3	1.2	1.5	0.3	1.3	2.7	1.4	1	2.2	1.2	1	2	1
	4	1	2.5	1.5	1.5	2.7	1.2	1	1.2	0.2	1	2	1
	5	1	2.2	1.2	1.3	2	0.7	1	1	0	1	2	1
	PROM	1.04	2.14	1.1	1.28	2.34	1.06	1	1.68	0.68	1.06	2.14	1.08
R2	1	1.1	2.5	1.4	1.2	3	1.8	1	2.2	1.2	1	1.5	0.5
	2	1	2.5	1.5	1	2	1	1	2.5	1.5	1	2	1
	3	1.2	2.5	1.3	1.3	3	1.7	1	1.5	0.5	1	1.5	0.5
	4	1.2	3	1.8	1	2.2	1.2	1.3	2	0.7	1.2	2	0.8
	5	1	2	1	1.5	3	1.5	1	1.5	0.5	1	2.4	1.4
	PROM	1.1	2.5	1.4	1.2	2.64	1.44	1.06	1.94	0.88	1.04	1.88	0.84
R3	1	1	2	1	1.5	2.8	1.3	1.3	2	0.7	1	1.5	0.5
	2	1	2.5	1.5	1	2.4	1.4	1	3.2	2.2	1	2.7	1.7
	3	1.3	3	1.7	1	2.7	1.7	1.3	2	0.7	1	2.5	1.5
	4	1.1	2	0.9	1.5	2.7	1.2	1.5	1.5	0	1	1.8	0.8
	5	1	1.5	0.5	1.5	3.6	2.1	1	3	2	1	2.2	1.2
	PROM	1.08	2.2	1.12	1.3	2.84	1.54	1.22	2.34	1.12	1	2.14	1.14



ANEXO 17

TABLAS DE ESTADISTICA DESCRIPTIVA

Tabla 1. Estadísticos descriptivos para tratamientos germinativos

Germinación			Media	Desviación estándar	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%	
Tipo de tratamiento		Límite inferior				Límite superior	
Tratamientos aplicados al Fruto	Promedio de semillas germinadas	T1	4,160	2,73778	,846	2,465	5,855
		T2	3,367	2,99754	,846	1,671	5,062
		T3	16,047	3,98889	,846	14,351	17,742
		T4	12,489	3,25349	,846	10,793	14,184
	Porcentaje de germinación	T1	10,393	6,84288	2,115	6,156	14,631
		T2	8,433	7,47708	2,115	4,196	12,671
		T3	40,080	9,97835	2,115	35,843	44,317
		T4	31,222	8,13372	2,115	26,985	35,460
Tratamientos aplicados a la Semilla	Promedio de semillas germinadas	0AG3	4,489	2,66627	,956	2,581	6,396
		5AG3	13,489	7,30608	,956	11,581	15,396
		10AG3	1,833	1,57692	,956	-,074	3,741
		15AG3	2,067	1,76082	,956	,159	3,974
		20AG3	2,293	1,59126	,956	,386	4,201
	Porcentaje de germinación	0AG3	11,213	6,65673	2,390	6,447	15,980
		5AG3	33,722	18,26521	2,390	28,956	38,488
		10AG3	4,611	3,91966	2,390	-,155	9,377
		15AG3	5,158	4,39961	2,390	,392	9,924
		20AG3	5,722	3,95745	2,390	,956	10,488

Elaboración: propia

Tabla 2. Estadísticos descriptivos para emergencia de cotiledones

			Emergencia de cotiledones				
Parte de la planta			Media	Desviación estándar	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
Fruto	Promedio de semillas emergidas	T1	2,556	1,01379	0,217	2,114	2,997
		T2	1,222	0,66667	0,217	0,780	1,664
		T3	13,889	0,33333	0,217	13,447	14,331
		T4	9,889	0,33333	0,217	9,447	10,331
	Porcentaje de emergencia	T1	69,889	23,70361	6,131	57,400	82,378
		T2	59,222	27,74337	6,131	46,733	71,711
		T3	88,222	3,83333	6,131	75,733	100,711
		T4	77,444	2,65100	6,131	64,956	89,933
Semilla	Promedio de semillas emergidas	0AG3	3,111	1,26930	0,792	1,510	4,712
		5AG3	7,889	5,03598	0,792	6,288	9,490
		10AG3	0,667	0,50000	0,792	-0,935	2,268
		15AG3	1,333	0,86603	0,792	-0,268	2,935
		20AG3	1,444	0,52705	0,792	-0,157	3,046
	Porcentaje de emergencia	0AG3	73,333	28,88771	10,582	51,946	94,721
		5AG3	62,222	39,89918	10,582	40,835	83,609
		10AG3	74,000	32,54228	10,582	52,613	95,387
		15AG3	57,222	33,26702	10,582	35,835	78,609
		20AG3	64,667	21,14237	10,582	43,279	86,054

Elaboración: propia

Tabla 3. Estadísticos descriptivos para hojas verdaderas

			Hojas Verdaderas				
Parte de la planta			Media	Desviación estándar	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
Fruto	Promedio de Hojas Verdaderas	T1	0,00	0,00000	,656	-1,335	1,335
		T2	0,259	0,14699	,656	-1,076	1,594
		T3	11,148	3,22366	,656	9,813	12,483
		T4	4,000	2,24846	,656	2,665	5,335
	Porcentaje de hojas verdaderas	T1	0,000	0,00000	4,633	-9,437	9,437
		T2	7,064	4,00507	4,633	-2,373	16,502
		T3	73,976	21,39123	4,633	64,538	83,413
		T4	30,769	17,29582	4,633	21,332	40,207
Semilla	Promedio de Hojas Verdaderas	0AG3	1,333	1,32288	,484	,354	2,312
		5AG3	2,667	2,87228	,484	1,688	3,646
		10AG3	0,222	,44096	,484	-,757	1,201
		15AG3	0,333	,50000	,484	-,646	1,312
		20AG3	0,111	,33333	,484	-,868	1,090
	Porcentaje de hojas verdaderas	0AG3	32,407	31,58005	8,814	14,593	50,221
		5AG3	21,111	21,29228	8,814	3,297	38,925
		10AG3	33,222	40,82517	8,814	15,408	51,036
		15AG3	12,889	16,05027	8,814	-4,925	30,703
		20AG3	3,667	11,00000	8,814	-14,147	21,481

Elaboración: propia

Tabla 4. Estadísticos descriptivos para Nudos

			Nudos			Intervalo de confianza al 95%	
Parte de la planta			Media	Desviación estándar	Error estándar	Límite inferior	Límite superior
Fruto	Promedio de nudos	T1	2,556	2,5556	,436	1,667	3,444
		T2	1,222	1,2222	,436	,333	2,111
		T3	14,074	14,0741	,436	13,185	14,963
		T4	4,000	4,0000	,436	3,111	4,889
	Porcentaje de nudos	T1	68,615	68,6153	6,716	54,935	82,296
		T2	59,259	59,2593	6,716	45,579	72,939
		T3	89,815	89,8154	6,716	76,135	103,496
		T4	30,769	30,7692	6,716	17,089	44,449
Semilla	Promedio de nudos	0AG3	3,111	3,1111	,792	1,511	4,711
		5AG3	7,889	7,8889	,792	6,289	9,489
		10AG3	0,778	,7778	,792	-,822	2,378
		15AG3	1,333	1,3333	,792	-,266	2,933
		20AG3	1,444	1,4444	,792	-,155	3,044
	Porcentaje de nudos	0AG3	73,148	73,1481	10,426	52,076	94,221
		5AG3	62,222	62,2222	10,426	41,150	83,295
		10AG3	75,889	75,8889	10,426	54,816	96,962
		15AG3	57,222	57,2222	10,426	36,150	78,295
		20AG3	64,667	64,6667	10,426	43,594	85,739

Elaboración: propia