



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE CUENCA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

EVALUACIÓN DE DOS PROTOCOLOS DE MICROPROPAGACIÓN EN

***Myrcianthes rhopaloides* Kunth**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de

Ingeniero Biotecnólogo

AUTORES: SANDRA MARINA CUENCA CHÁVEZ

DIEGO ANDRES DUY SOTAMBA

TUTORA: DRA. INÉS PATRICIA MALO CEVALLOS, Ph.D.

Cuenca - Ecuador

2024

CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotros, Sandra Marina Cuenca Chávez con documento de identificación N° 0105748743 y Diego Andres Duy Sotamba con documento de identificación N° 0302691605; manifestamos que:

Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Cuenca, 08 de marzo del 2024.

Atentamente,



Sandra Marina Cuenca Chávez

0105748743



Diego Andres Duy Sotamba

0302691605

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Nosotros, Sandra Marina Cuenca Chávez con documento de identificación N° 0105748743 y Diego Andres Duy Sotamba con documento de identificación N° 0302691605, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del Trabajo experimental: “Evaluación de dos protocolos de micropropagación en *Myrcianthes rhopaloides* Kunth”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero Biotecnólogo, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 08 de marzo del 2024.

Atentamente,



Sandra Marina Cuenca Chávez

0105748743



Diego Andres Duy Sotamba

0302691605

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Inés Patricia Malo Cevallos con documento de identificación N° 0102291044, docente de la Universidad Politécnica Salesiana declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: EVALUACIÓN DE DOS PROTOCOLOS DE MICROPROPAGACIÓN EN *Myrcianthes rhopaloides* Kunth, realizado por Sandra Marina Cuenca Chávez con documento de identificación N° 0105748743 y por Diego Andres Duy Sotamba con documento de identificación N° 0302691605, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 08 de marzo del 2024.

Atentamente,



Dra. Inés Patricia Malo Cevallos, Ph.D.

0102291044

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTO

Agradecimiento de Sandra:

Confiar en Dios en cada paso del camino es la clave para superar los desafíos y alcanzar nuestras metas. Sin él no hubiera sido posible culminar esta etapa, este logro no solo es mío, sino de aquellas personas que han estado a mi lado, brindándome su apoyo fundamental, mi familia especialmente mis padres. Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi papá Juan Cuenca, por ser mi pilar, mi fuente de fuerza, mi apoyo incondicional en cada paso del camino es un regalo invaluable que nunca podre agradecer lo suficiente. Me siento agradecida también con mi madre Lupita por brindarme siempre sus buenos valores y su amor incondicional en esta etapa de mi vida.

Por último, agradecer a todos mis amigos, que me acompañaron en esta etapa por compartir conmigo risas, lágrimas, conocimientos y muchos momentos inolvidables, A mis profesores, por su sabiduría.

Siempre llevare conmigo los valiosos recuerdos y lecciones aprendidas durante este tiempo, espero seguir contando con cada uno, en los próximos capítulos de mi vida.

Agradecimiento de Diego:

"Detrás de cada logro alcanzado, hay sueños compartidos, esfuerzos conjuntos y corazones llenos de esperanza." Esta frase encapsula perfectamente la esencia de mi viaje hacia la culminación de mi carrera universitaria. No ha sido un camino que he recorrido en solitario; al contrario, ha estado marcado por el amor y el apoyo inquebrantable de mi familia, amigos y mentores.

Mis padres, Andrés y Eugenia, han sido el cimiento de mis aspiraciones. Desde mi infancia, me inculcaron el valor de la perseverancia y la importancia de perseguir mis sueños con dedicación. Su fe inquebrantable en mí y su convicción de que, con perseverancia y esfuerzo, no existen metas imposibles, han sido el faro que me ha guiado a través de los desafíos y las incertidumbres. A mis hermanas, Lorena y Cinthia, les debo mi gratitud por ser más que familia; han sido aliadas incondicionales, proporcionándome momentos de alegría y serenidad cuando más los necesitaba. Su apoyo constante y comprensión han reforzado en mí el valor de la unidad y el apoyo mutuo.

El viaje académico está igualmente marcado por las amistades forjadas en el camino. A mis amigos de la universidad, gracias por su cariño y apoyo incondicional. Cada gesto de ánimo y cada palabra de aliento han sido como faros de luz, guiándome hacia este logro. A nuestra tutora Dra. Inés Malo gracias por su orientación experta, paciencia y respaldo constante.

Finalmente, a Marina, mi compañera de tesis, gracias por compartir esta travesía intelectual. Tu pasión y compromiso con la biotecnología han sido fundamentales para nuestro éxito. Juntos, hemos enfrentado desafíos y celebrado triunfos, forjando no solo conocimiento, sino también una gran amistad.

Este logro es el resultado de un esfuerzo colectivo, tejido con perseverancia y sacrificios de quienes me rodean. Han sido el soporte emocional indispensable para superar cada obstáculo, y este éxito es tan suyo como mío.

Gracias por enseñarme que, con apoyo y unidad, no hay sueño inalcanzable.

Resumen

La presente investigación se centró en evaluar la eficacia de dos tratamientos desinfectantes, el hipoclorito de sodio y el amonio cuaternario con reguladores de crecimiento, 6-bencilaminopurina [BAP] y ácido naftalenacético [ANA], y el medio nutritivo Murashige y Skoog, enriquecido con vitaminas de Gamborg. Los objetivos específicos fueron comparar la supervivencia y fenolización de tejidos vegetales *in vitro* después de la aplicación de dichos tratamientos y determinar la consistencia de los resultados a través de un análisis estadístico riguroso.

Se realizó un diseño experimental donde se aplicaron dos tratamientos distintos t1 y t2 con hipoclorito de sodio y amonio cuaternario, respectivamente. Los datos recolectados se presentaron en gráficos de caja, los cuales revelaron diferencias significativas en la supervivencia y fenolización entre los tratamientos. El tratamiento con hipoclorito de sodio mostró una mayor variabilidad en la reducción de la contaminación y la fenolización, mientras que el tratamiento con amonio cuaternario resultó en una mayor consistencia y eficacia en términos de supervivencia de las muestras.

Los resultados indican que el amonio cuaternario podría ser preferible para el tratamiento de tejidos vegetales *in vitro* debido a su mayor capacidad para mantener la supervivencia de las muestras con una menor inducción de fenoles, lo cual es crucial para la propagación de cultivos vegetales saludables. Esta investigación contribuye al desarrollo de prácticas de laboratorio optimizadas, proponiendo modificaciones en los protocolos de desinfección que pueden mejorar la calidad de los tejidos vegetales para investigaciones de biotecnología vegetal.

Palabras clave: tejido vegetal, desinfección, hipoclorito de sodio, amonio cuaternario, supervivencia, fenolización.

Abstract

This research focused on evaluating the efficacy of two disinfectant treatments, sodium hypochlorite and quaternary ammonium with growth regulators, 6-benzylaminopurine [BAP] and naphthaleneacetic acid [NAA], and the Murashige and Skoog nutritive medium, enriched with Gamborg's vitamins. The specific objectives were to compare the survival and phenolization of *in vitro* plant tissues after the application of these treatments and to determine the consistency of the results through rigorous statistical analysis.

An experimental design was conducted where two different treatments, t1 and t2, with sodium hypochlorite and quaternary ammonium, respectively, were applied. The collected data were presented in box plots, which revealed significant differences in survival and phenolization between treatments. The treatment with sodium hypochlorite showed greater variability in the reduction of contamination and phenolization, whereas the treatment with quaternary ammonium resulted in greater consistency and efficacy in terms of sample survival.

The results indicate that quaternary ammonium could be preferable for the treatment of *in vitro* plant tissues due to its greater ability to maintain sample survival with lower induction of phenols, which is crucial for the propagation of healthy plant cultures. This research contributes to the development of optimized laboratory practices, proposing modifications in disinfection protocols that can improve the quality of plant tissues for plant biotechnology research.

Keywords: plant tissue, disinfection, sodium hypochlorite, quaternary ammonium, survival, phenolization.

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTO	5
Resumen	7
Abstract.....	8
CAPÍTULO 1	16
INTRODUCCIÓN	16
1.1 Problema.....	17
1.2 Importancia y alcances	18
1.2 Delimitación	18
1.3 Pregunta de investigación.....	19
1.4 Objetivos	20
1.5 Hipótesis.....	20
CAPÍTULO 2	21
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	21
2.1 <i>Myrcianthes rhopaloides</i> Kunth en Ecuador.....	21
2.2 <i>Myrcianthes rhopaloides</i> Kunth.....	22
2.3 Micropropagación <i>in vitro</i>	24
CAPÍTULO 3	28
MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1 Materiales	28
3.2 Metodología	31
3.3 Diseño experimental.....	34

	10
CAPÍTULO 4	36
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
4.1 Análisis estadístico.....	36
4.2 Evaluación de la fenolización con el Protocolo 1. Hipoclorito de sodio	40
4.3 Evaluación de la supervivencia con el Protocolo 1. Hipoclorito de sodio.....	42
4.4 Evaluación de la contaminación con el Protocolo 2. Amonio cuaternario	45
4.5 Evaluación de la fenolización con el Protocolo 2. Amonio cuaternario	48
4.6 Evaluación de la supervivencia con el Protocolo 2. Amonio cuaternario.....	51
4.7 Comparación del Protocolo 1 en relación con la contaminación, supervivencia y fenolización	54
4.8 Comparación del Protocolo 2 en relación con la contaminación, supervivencia y fenolización	55
4.9 Discusión.....	56
CAPÍTULO 5	59
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	59
5.1 Conclusiones	59
5.2 Recomendaciones.....	60
6 REFERENCIAS	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	23
<i>Taxonomía Myrcianthes rhopaloides Kunth</i>	23
Tabla 2	34
<i>Diseño experimental</i>	34
Tabla 3	36
<i>Distribución de los datos para el análisis estadístico</i>	36
Tabla 4	37
<i>Evaluación del porcentaje de contaminación en explantes de M. rhopaloides empleando como agente desinfectante el hipoclorito de sodio [Protocolo 1]</i>	37
Tabla 5	38
<i>Resultados de la evaluación de la distribución normal de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk para la variable respuesta contaminación [Protocolo 1]</i>	38
Tabla 6	39
<i>Resultados del ANOVA para la variable respuesta contaminación [Protocolo 1]</i>	39
Tabla 7	40
<i>Evaluación del porcentaje de fenolización en explantes de M. rhopaloides empleando como agente desinfectante el hipoclorito de sodio [Protocolo 1]</i>	40
Tabla 8	40
<i>Resultados de la evaluación de la distribución normal de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk para la variable respuesta fenolización [Protocolo 1]</i>	40
Tabla 9	41
<i>Resultados del ANOVA para la variable respuesta fenolización [Protocolo 1]</i>	41
Tabla 10	43

<i>Evaluación del porcentaje de supervivencia en explantes de M. rhopaloides empleando como agente desinfectante el hipoclorito de sodio [Protocolo 1].....</i>	43
Tabla 11	43
<i>Resultados de la evaluación de la distribución normal de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk para la variable respuesta supervivencia [Protocolo 1]</i>	43
Tabla 12	44
<i>Resultados del ANOVA para la variable respuesta supervivencia [Protocolo 1]</i>	44
Tabla 13	46
<i>Evaluación del porcentaje de contaminación en explantes de M. rhopaloides empleando como agente desinfectante amonio cuaternario [Protocolo 2].....</i>	46
Tabla 14	46
<i>Resultados de la evaluación de la distribución normal de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk para la variable respuesta contaminación [Protocolo 2]</i>	46
Tabla 15	47
<i>Resultados del ANOVA para la variable respuesta contaminación [Protocolo 2].....</i>	47
Tabla 16	49
<i>Evaluación del porcentaje de fenolización en explantes de M. rhopaloides empleando como agente desinfectante amonio cuaternario [Protocolo 2].....</i>	49
Tabla 17	49
<i>Resultados de la evaluación de la distribución normal de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk para la variable respuesta fenolización [Protocolo 2]</i>	49
Tabla 18	50
<i>Resultados del ANOVA para la variable respuesta fenolización [Protocolo 2]</i>	50
Tabla 19	52

<i>Evaluación del porcentaje de supervivencia en explantes de M. rhopaloides empleando como agente desinfectante amonio cuaternario [Protocolo 2]</i>	52
Tabla 20	52
<i>Resultados de la evaluación de la distribución normal de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk para la variable respuesta supervivencia [Protocolo 2]</i>	<i>52</i>
Tabla 21	53
<i>Resultados del ANOVA para la variable respuesta supervivencia [Protocolo 1]</i>	<i>53</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	26
Preparación del medio de cultivo	26
Figura 2	30
Árbol de <i>Myrcianthes rhopaloides</i> Kunth	30
Figura 3	30
Recolección de la muestra	30
Figura 4	31
Materiales que se utilizaron para realizar los protocolos, y siembra de yemas de <i>M. rhopaloides</i> Kunth.	31
Figura 5	32
Materiales que se utilizó para realizar los protocolos de desinfección.....	32
Figura 6	33
Trabajo dentro de la cámara de flujo laminar	33
Figura 7	38
Evaluación de la distribución normal de los datos mediante el gráfico Cuantil-Cuantil [Q-Q plot] para la variable respuesta contaminación [Protocolo 1]	38
Figura 8	39
Diagrama de cajas y bigotes para la variable respuesta contaminación	39
Figura 9	41
Evaluación de la distribución normal de los datos mediante el gráfico Cuantil-Cuantil [Q-Q plot] para la variable respuesta fenolización [Protocolo 1]	41
Figura 10	42
Diagrama de cajas y bigotes para la variable respuesta fenolización	42
Figura 11	44

Evaluación de la distribución normal de los datos mediante el gráfico Cuantil-Cuantil [Q-Q plot] para la variable respuesta supervivencia [Protocolo 1].....	44
Figura 12	45
Diagrama de cajas y bigotes para la variable respuesta supervivencia	45
Figura 13	47
Evaluación de la distribución normal de los datos mediante el gráfico Cuantil-Cuantil [Q-Q plot] para la variable respuesta contaminación [Protocolo 2]	47
Figura 14	48
Diagrama de cajas y bigotes para la variable respuesta contaminación	48
Figura 15	50
Evaluación de la distribución normal de los datos mediante el gráfico Cuantil-Cuantil [Q-Q plot] para la variable respuesta fenolización [Protocolo 2]	50
Figura 16	51
Diagrama de cajas y bigotes para la variable respuesta fenolización.....	51
Figura 17	53
Evaluación de la distribución normal de los datos mediante el gráfico Cuantil-Cuantil [Q-Q plot] para la variable respuesta supervivencia [Protocolo 2].....	53
Figura 18	54
Diagrama de cajas y bigotes para la variable respuesta supervivencia	54
Figura 19	55
Gráfica de la contaminación, supervivencia y fenolización de los diferentes tratamientos con hipoclorito de sodio	55
Figura 20	56
Gráfica de la contaminación, supervivencia y fenolización de los diferentes tratamientos con Amonio cuaternario	56

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

La propagación de plantas mediante técnicas *in vitro* ha revolucionado el campo de la Biotecnología Vegetal, permitiendo cultivar plantas en condiciones altamente controladas, lo que optimiza su crecimiento, rendimiento y calidad. Estas técnicas, aunque potentes, requieren un control estricto de diversos factores, siendo la esterilización uno de los más cruciales (Walker, s. f.) Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales son ampliamente adoptadas en la Biotecnología para una variedad de aplicaciones, desde investigaciones sobre el desarrollo de plantas hasta la mejora de cultivos (Loyola-Vargas & Ochoa-Alejo, 2018). Sin embargo, los ambientes *in vitro*, pese a ser ideales para el cultivo de plantas, también son propicios para el desarrollo de microorganismos contaminantes. Estos pueden ser tanto externos como internos al tejido vegetal, complicando el proceso de desinfección y haciendo vital la asepsia en la micropropagación (Silva et al., 2016). Además, la procedencia del material vegetal juega un papel crucial en la contaminación potencial, ya que las plantas de campo pueden albergar una mayor cantidad de contaminantes que las cultivadas en invernaderos (Machado et al., 2020). En particular, la micropropagación de plantas procedentes de bosques tropicales presenta desafíos adicionales debido a su diversidad de contaminantes (Putri et al., 2019).

Frente a estos desafíos, es esencial desarrollar protocolos de desinfección efectivos que equilibren la eliminación de agentes contaminantes y la viabilidad de los explantes (Lazo-Javalera et al., 2016). En este contexto, la presente investigación busca evaluar el impacto de dos protocolos de micropropagación en *Myrcianthes rhopaloides* Kunth, una especie de interés, para determinar la eficiencia de cada uno. La justificación radica en la importancia de la micropropagación para la conservación y propagación eficiente de

especies vegetales, especialmente aquellas de gran valor ambiental, como *M. rhopaloides* Kunth. Sin embargo, es importante tener en cuenta ciertas limitaciones, como la naturaleza del material biológico utilizado y el tiempo necesario para la observación y evaluación de resultados.

Con objetivos claros, esta investigación contribuirá significativamente al campo de la biotecnología vegetal, abordando las complejidades y desafíos asociados con la micropropagación de especies de interés y proporcionando conocimientos valiosos para futuras investigaciones y aplicaciones prácticas.

1.1 Problema

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* representa un enfoque biotecnológico crucial para la micropropagación y mejora de plantas, permitiendo un control preciso de factores ambientales que influyen en su crecimiento, rendimiento y calidad (Walker, s. f.). Este proceso es fundamental en la investigación del desarrollo vegetal, en la generación de plantas transgénicas y en el fitomejoramiento (Loyola-Vargas & Ochoa-Alejo, 2018). Sin embargo, un desafío significativo en la micropropagación *in vitro* es la contaminación por microorganismos como hongos, levaduras, bacterias y microartrópodos, además de virus y viroides (Brondani et al., 2013).

La contaminación es particularmente problemática cuando los explantes se obtienen de plantas de campo, especialmente en bosques tropicales, donde la diversidad de contaminantes es mayor comparada con los bosques templados. Estos contaminantes pueden ser epífitos o endofíticos, complicando la detección y el tratamiento de la contaminación en las etapas iniciales de cultivo (Putri et al., 2019). Además, la efectividad de los métodos de desinfección se ve obstaculizada por la presencia de agentes contaminantes, lo que demanda la búsqueda de protocolos alternativos que equilibren la reducción de la infección con la supervivencia y regeneración de los explantes. Dicho

equilibrio depende críticamente del estado fisiológico de los explantes y la toxicidad de los desinfectantes para las células vegetales (Lazo & Javalera et al., 2016).

1.2 Importancia y alcances

La técnica de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es esencial en la biotecnología vegetal, no solo por su capacidad para la micropropagación y obtención de plantas libres de patógenos, sino también por su papel en la preservación del germoplasma, el mejoramiento genético y la investigación básica en áreas como Genética, Fisiología y Bioquímica (Phillips & Garda, 2019). Esta técnica permite una producción masiva de plantas en espacios reducidos y en cualquier época del año, contribuyendo significativamente a la industria hortícola y agrícola. Además, el cultivo *in vitro* es crucial en la conservación de especies vegetales en peligro de extinción, permitiendo la reproducción y propagación de plantas a partir de tejidos vegetales sin necesidad de semillas ni polinización (Pérez et al., s. f.).

El cultivo *in vitro* supera barreras reproductivas naturales, facilitando la propagación de especies difíciles de multiplicar por otros métodos o en peligro de extinción. Además, esta técnica es efectiva en la producción de plantas libres de enfermedades, ya que el proceso de cultivo se realiza en condiciones estériles, reduciendo significativamente el riesgo de contaminación por patógenos. Es especialmente valiosa para la conservación a largo plazo de especies vegetales en bancos de germoplasma, donde se preserva la diversidad genética de estas especies (Enriquez et al., 2020).

1.2 Delimitación

La presente investigación evaluó dos protocolos de micropropagación en *M. rhopaloides Kunth*, una especie nativa de importancia. Se examinó específicamente el impacto de dos agentes desinfectantes, hipoclorito de sodio y amonio cuaternario, así como de dos biorreguladores, la 6-Bencilaminopurina y el Ácido naftalenacético, en el desarrollo de

las yemas axilares y apicales de esta especie. Se centrará en la efectividad de los protocolos, considerando la contaminación y desarrollo de los explantes. El estudio se llevó a cabo en un ambiente de laboratorio controlado, siguiendo protocolos específicos para la micropropagación. Además, se incluyó un análisis detallado de los resultados mediante herramientas estadísticas, lo cual facilitará la formulación de recomendaciones concretas para mejorar la técnica de micropropagación de *M. rhopaloides* Kunth.

1.2.1 Delimitación geográfica

Se recolectaron yemas axilares y apicales de *M. rhopaloides* en la avenida 24 de mayo, cerca del río Tomebamba en Cuenca, se seleccionaron ejemplares sanos para la micropropagación. El proceso de recolección se llevó a cabo en tres etapas: la primera en noviembre y las dos siguientes en diciembre del año 2023. Posteriormente, estas yemas fueron trasladadas al Laboratorio de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana, sede Cuenca, para iniciar los protocolos de desinfección y micropropagación. Durante dos meses, hasta finales de enero de 2024, se realizó un seguimiento cada diez días en la cámara de crecimiento del laboratorio de Biotecnología Vegetal, observando el desarrollo de los explantes bajo condiciones controladas.

1.3 Pregunta de investigación

¿Qué protocolo presenta una menor tasa de contaminación en los explantes de *Myrcianthes rhopaloides* Kunth y un mayor potencial de desarrollo?

Con el fin de identificar el protocolo más efectivo para la desinfección de yemas, se llevó a cabo una revisión bibliográfica que abarcará diversas metodologías de tratamientos de yemas. A partir de esta revisión, se seleccionaron dos protocolos que fueron sometidos a una comparación en términos de eficacia y su capacidad de promover la respuesta morfogénica de las yemas.

1.4 Objetivos

1.4.1 General

- Evaluar dos protocolos de micropropagación en el crecimiento, desarrollo y viabilidad de *Myrcianthes rhopaloides* Kunth, mediante pruebas en laboratorio determinando cuál de ellos ofrece resultados más eficientes.

1.4.2 Específicos

- Realizar una revisión bibliográfica de la literatura científica disponible hasta la fecha sobre la micropropagación de *Myrcianthes rhopaloides* Kunth, identificando los diferentes métodos y técnicas empleadas, compilando la información existente.
- Ejecutar los protocolos de micropropagación a través de experimentos en el laboratorio, centrándose en el desarrollo y crecimiento de las yemas de *Myrcianthes rhopaloides* Kunth.
- Analizar los resultados recolectados utilizando herramientas estadísticas, ofreciendo recomendaciones concretas para el proceso de micropropagación de *Myrcianthes rhopaloides* Kunth.

1.5 Hipótesis

A continuación, se presenta la hipótesis relacionada al presente trabajo de investigación:

Si hay una diferencia significativa entre los dos protocolos, entonces el que demuestra mejores resultados es considerado idóneo para la micropropagación de *Myrcianthes rhopaloides* Kunth.

CAPÍTULO 2

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

Myrcianthes. rhopaloides Kunth conocido como “Arrayan negro” es un árbol de América del Sur, perteneciente a la familia Myrtaceae, esta especie se distingue por formar grupos homogéneos junto con pequeños arbustos. *M. rhopaloides* se caracteriza por poseer un periodo de producción de frutos, lo que la convierte en una de las especies forestales y maderables más valoradas a nivel mundial (Maldonado & Dacarro et al., 2020).

2.1 *Myrcianthes rhopaloides* Kunth en Ecuador

Se caracteriza como un árbol autóctono de la serranía ecuatoriana, el “Arrayán negro” destaca en diversas regiones del país. En las provincias del Carchi, Azuay, Imbabura y Sucumbíos, principalmente en la provincia del Carchi se identifican áreas de concentración, una de ellas es el “Bosque de Arrayanes”, con una extensión de 4 ha aproximadamente (López & Galvis et al., 2020).

La ubicación geográfica para la recolección de yemas se realizó en la provincia del Azuay, la especie *M. rhopaloides* Kunth, en el Azuay se caracteriza por ser una especie inexplorada, sin embargo, se sitúa a lo largo de las orillas del río Tomebamba, específicamente en la avenida 24 de mayo y calle Guadalajara.

2.1.1 Distribución de *Myrcianthes rhopaloides* Kunth en la región andina

M. rhopaloides Kunth es una especie propia de bosques húmedos ubicados en las laderas de las montañas, siendo una especie que se encuentra bajo conservación, se desarrolla principalmente en altitudes de 3500-msnm. Su existencia está debidamente documentada en las montañas de diversos países como: Ecuador, Colombia, Perú, Panamá, Bolivia, y los Andes de Venezuela (Espinosa, 2021).

2.2 *Myrcianthes rhopaloides* Kunth

Esta especie es próspera en bosques conservados y presenta un crecimiento notablemente lento. Este tipo de árbol requiere de suelos fértiles y un entorno húmedo para desarrollarse adecuadamente. Por esta razón, resulta ideal para ser plantada en las orillas de quebradas de los ríos. No obstante, dado su crecimiento pausado, es crucial proporcionar las condiciones idóneas que favorezcan su buen desarrollo (Granados et al., 2014).

2.2.1 Usos

M. rhopaloides Kunth se distingue por su alta densidad y estabilidad frente al deslizamiento, y resistencia. Este árbol no solo produce frutos comestibles tanto para humanos como para animales, sino que también se utiliza para la fabricación de muebles estructurales como por ejemplo puertas, muebles, objetos decorativos, escaleras y barandillas. Ofreciendo una calidad excepcional para la necesidad del hombre (Curipoma et al., 2018).

2.2.2 Morfología

Esta especie se distingue como un árbol de gran tamaño, alcanzando aproximadamente 25 m de altura, con un diámetro que oscila entre 40 a 70 cm. Su corteza exhibe parches rojos de tono claro, los cuales se exfolian en láminas. Sus hojas son ovaladas pequeñas y simples, con un haz de color verde oscuro. Se caracteriza por ser una especie de follaje constante (Maldonado & Dacarro et al., 2020).

Las flores presentan pétalos blancos. Sus semillas, desprovistas de endospermo presente de manera escasa, siendo una cualidad notable. El fruto presenta una tonalidad negra casi violeta, esto se vuelve apto para el consumo tanto humano como animal, al madurar el fruto tiene sabor dulce y es agradable. Este árbol tiende a fructificar durante los meses de enero hasta marzo. (Curipoma et al., 2018).

2.2.3 Clasificación taxonómica

La taxonomía biológica es un sistema de clasificación que organiza la diversidad de la vida en una estructura jerárquica, proporcionando una base para la comprensión de las relaciones evolutivas y funcionales entre las diferentes formas de vida. En el estudio de la botánica, la clasificación taxonómica se convierte en un eje central para la identificación y el estudio de plantas, facilitando así el intercambio de información científica y la colaboración entre investigadores. La Tabla 1 que se presenta a continuación, ilustra la clasificación taxonómica de *M. rhopaloides* Kunth, una especie perteneciente al reino Plantae, que ha sido clasificada de acuerdo a la nomenclatura binomial y las categorías taxonómicas estándar.

Tabla 1

Taxonomía Myrcianthes rhopaloides Kunth

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

Fuente: (Diniz et al., 2014)

2.3 Micropropagación *in vitro*

La micropropagación, una técnica que implica la reproducción vegetal realizada en un entorno artificial y controlado con el uso de un medio de cultivo específico, emerge como una herramienta sumamente valiosa en el ámbito del mejoramiento genético. Su potencial para producir plantas de calidad en escala comercial, a partir de genotipos selectos es notable. Este proceso se basa en las propiedades de totipotencia de las células vegetales, que les otorga la capacidad única de regenerar una planta completa cuando son estimuladas adecuadamente (Carvalho et al., 2021)

El cultivo *in vitro* se lleva a cabo considerando las características particulares de la planta que se desea propagar y de los objetivos específicos perseguido. Se pueden emplear tres vías distintas de regeneración: la brotación de yemas adventicias preexistentes, la producción de yemas y embriogénesis. La elección entre estas opciones dependerá de la naturaleza y las metas del cultivo, este enfoque versátil de micropropagación permite maximizar la eficiencia en la producción de las plantas de alta calidad, contribuyendo así al avance continuo en la mejora de especies vegetales (Levitus et al., 2019)

2.3.1 Cultivo de tejido de *Myrcianthes rhopaloides* Kunth

La técnica de cultivo de tejidos se fundamenta en la asombrosa capacidad de las células vegetales para regenerar una planta que es genéticamente idéntica a la original. En el establecimiento *in vitro*, se seleccionan cuidadosamente para asegurar una regeneración ideal. Se ha observado que los tejidos meristemáticos jóvenes, tales como yemas axilares o apicales, embriones y semillas, poseen una capacidad regenerativa más destacada (Carvalho et al., 2021).

En el caso específico de *M. rhopaloides* Kunth, se optó por trabajar con explantes de yemas.

2.3.2 Medio de cultivo

Uno de los factores que influyen en el crecimiento y la morfogénesis de los tejidos cultivados *in vitro*, es la composición del medio de cultivo (Echenique, 2017).

Los nutrientes esenciales necesarios para el desarrollo de las células vegetales guardan similitud con aquellos presentes en el suelo natural para el crecimiento de las plantas. A lo largo de distintas investigaciones, diversos científicos han abordado el estudio de las composiciones de los medios de cultivo que han generado fórmulas ajustadas a los requisitos específicos (Galíndez, 2020).

El medio de cultivo ideal se compone principalmente de macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, azúcares y reguladores de crecimiento [Figura 1]. Sin embargo, es importante destacar que la composición de este medio puede experimentar variaciones significativas según el genotipo de la especie en consideración (Echenique, 2017).

En el caso específico para los explantes de *M. rhopaloides* Kunth, se emplearon reguladores de crecimiento, como citoquinina vegetal, específicamente 6-bencilaminopurina [BAP] y auxinas sintéticas como el ácido naftalenacético [ANA]. Además, se incorporaron sales minerales de la formulación Murashige y Skoog [MS], suplementado con vitaminas de Gamborg.



Figura 1
Preparación del medio de cultivo

Fuente: Los Autores, 2024

2.3.3 Protocolos de desinfección

Para llevar a cabo la desinfección superficial de los explantes, se emplearon compuestos químicos con el propósito de eliminar los microorganismos con el mínimo daño posible para el material vegetal, una vez seleccionado el medio de cultivo y el explante, se utilizaron desinfectantes que penetran en el tejido y eliminan cualquier agente contaminante presente. Es fundamental reconocer que no todos los explantes requieren el mismo proceso de desinfección, ya que la morfología y el tejido varían, igualmente las condiciones ambientales a las que se encuentran expuestos los explantes (Loyola & Vargas, 2018).

En esta ocasión con *M. rhopaloides* Kunth, para la recolección de yemas, estas fueron introducidas en un frasco con jabón antibacteriano durante 20 min y se mantuvieron hasta la ejecución de los cuatro tratamientos según los protocolos establecidos. Dentro de la cámara de flujo laminar, los explantes fueron sometidos a un tratamiento con Tween-20,

seguido de una inmersión en etanol al 70% v/v. Posteriormente, se aplicó una solución de hipoclorito de sodio o amonio cuaternario, siendo estos seleccionados como agentes desinfectantes para este procedimiento.

2.3.4 Siembra de los explantes en medios de cultivo

La fase de la siembra de los explantes debe llevarse a cabo en condiciones de rigurosa asepsia. Para lograr esto, se sigue un protocolo de desinfección meticuloso en el interior de la cámara de flujo laminar.

En este proceso, la superficie en donde se va a trabajar se asperja con alcohol antiséptico, y los instrumentos necesarios se esterilizan previamente en la autoclave y se mantienen constantemente flameados.

Durante la siembra del explante en el medio de cultivo, se debe considerar una serie de precauciones que involucran una manipulación adecuada tanto de los materiales de siembra como de las yemas axilares y apicales de *M. rhopaloides* Kunth.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Material de oficina

En el transcurso de la investigación, se implementó la utilización de cuadernillos con el objetivo de documentar meticulosamente el avance y evolución morfogénica de los explantes a lo largo del experimento. Adicionalmente, se recurrió al uso de papel de aluminio para recubrir el material de vidrio previo a su proceso de esterilización en autoclave, lo cual contribuyó a asegurar la asepsia de los instrumentos empleados en los protocolos experimentales. De manera complementaria, se aplicó *film* plástico para el sellado hermético de tubos y frascos que albergaban los explantes, facilitando de esta forma la creación de un ambiente estéril y libre de contaminantes en la cámara de flujo laminar.

3.1.2 Reactivos

En la fase experimental, se procedió a la desinfección de las superficies de trabajo, el material de vidrio y el interior de la cámara de flujo laminar empleando etanol al 70%. Posteriormente, se diseñaron e implementaron dos protocolos de desinfección. El primer protocolo consistió en la elaboración de tres soluciones distintas: una solución de Tween 20, etanol al 70%, y soluciones de hipoclorito de sodio con concentraciones de 1,5% y 2%. De forma paralela, el segundo protocolo implicó la preparación de tres soluciones alternativas, incorporando compuestos de amonio cuaternario en concentraciones de 1,5% y 2%, además de Tween 20 y etanol al 70%. Es relevante señalar que dichos protocolos experimentaron modificaciones a lo largo del estudio, en respuesta a la

observación de que no facilitaban de manera efectiva la micropropagación de *M. rhopaloides*.

Adicionalmente, se optó por el medio de cultivo Murashige y Skoog [MS], enriquecido con vitaminas de Gamborg, seleccionado por su capacidad para fomentar un ambiente idóneo para el desarrollo de los explantes. Para el ajuste del pH en el medio de cultivo se efectuó mediante la adición controlada de ácido clorhídrico 2N e hidróxido de sodio 2N.

3.1.3 Material vegetal

Los explantes de *M. rhopaloides* Kunth fueron recolectados en la ciudad de Cuenca, específicamente de ejemplares situados en las proximidades del río Tomebamba, ubicados en las coordenadas geográficas -2.893744, -78.964818, según datos proporcionados por Google Maps [Figura 2]. La recolección se planificó meticulosamente, seleccionando para dicho fin árboles que exhibían características de crecimiento vigoroso y sano, previa inspección para asegurar la ausencia de patologías o daños físicos [Figura 3].

El proceso de recolección se inició el 28 de noviembre de 2023, empleando instrumentos de poda esterilizados y en estado óptimo para tal fin. Un segundo evento de recolección se efectuó el 8 de diciembre de 2023, replicando el protocolo de cuidados y preparación estipulado. La tercera y última recolección se realizó el 18 de diciembre de 2023, manteniendo idénticas condiciones de manejo.

Una vez recolectados, los explantes fueron transportados cuidadosamente al laboratorio en condiciones controladas. Para el tratamiento preliminar de lavado, teniendo cuidado en preservar la integridad de los explantes hasta el inicio de los respectivos tratamientos experimentales.



Figura 2

Árbol de *Myrcianthes rhopaloides* Kunth

Fuente: Los Autores, 2024



Figura 3

Recolección de la muestra

Fuente: Los Autores, 2024

3.2 Metodología

3.2.1 Preparación de las yemas

En el laboratorio, se inició el proceso desinfectando externamente las yemas con una solución de Tween 20 diluida en agua destilada. Tras esta primera fase, se aplicó alcohol al 70% sobre las yemas, preparándolas para ser introducidas en la cámara de flujo laminar. Dentro de la cámara, se dispusieron todos los elementos necesarios para el procedimiento: un mechero, material esterilizado como pinzas, bisturíes, y cajas de Petri, además de otros materiales útiles como *film* y marcadores [Figura 4].

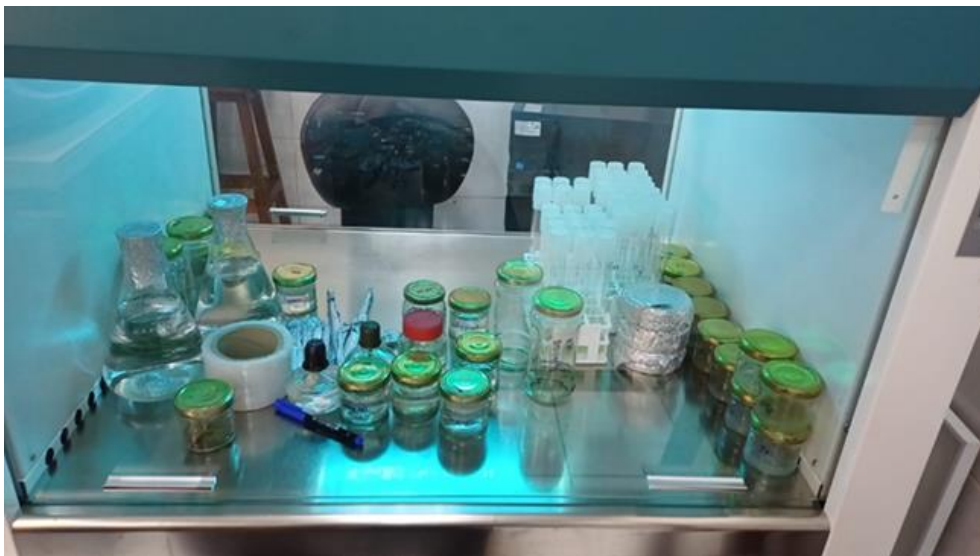


Figura 4

Materiales que se utilizaron para realizar los protocolos, y siembra de yemas de *M. rhopaloides* Kunth.

Fuente: Los Autores, 2024

Una vez en la cámara, se procedió con cuidado a la extracción de las yemas, utilizando el bisturí y las pinzas para su manejo. Las yemas extraídas se colocaron en las cajas de Petri, que posteriormente fueron selladas y etiquetadas cuidadosamente. Este meticuloso proceso se llevó a cabo para cada una de las yemas, asegurando así una manipulación y clasificación eficiente y ordenada, vital para el éxito del experimento.

3.2.2 Protocolo de desinfección de las yemas

En el desarrollo del primer protocolo de desinfección, se procedió a la preparación de tres recipientes, cada uno conteniendo distintas soluciones desinfectantes: Tween 20, etanol al 70%, e hipoclorito de sodio en concentraciones del 1,5% y 2,0% [Figura 5]. De forma paralela, se estableció un segundo protocolo, igualmente integrado por tres recipientes, diferenciándose en la inclusión de soluciones de amonio cuaternario en concentraciones del 1,5% y 2,0%, además de Tween 20 y etanol al 70%. Se procedió también a definir meticulosamente los tiempos de inmersión de los explantes en las soluciones desinfectantes: se determinó un tiempo de inmersión de 10 minutos para el Tween 20, 1 minuto para el etanol, y tiempos variables para el hipoclorito de sodio y el amonio cuaternario, inicialmente fijados en 15 y 20 minutos respectivamente, ajustándose estos últimos en función de las observaciones realizadas durante el experimento. Este procedimiento minucioso garantizaba la óptima preparación y desinfección de los explantes, estableciendo las condiciones adecuadas para avanzar a las etapas subsiguientes del estudio.



Figura 5

Materiales que se utilizó para realizar los protocolos de desinfección.

Fuente: Los Autores, 2024

3.2.3 Siembra en la cámara de flujo laminar

Tras el proceso de desinfección, se procedió a sembrar los explantes en los tratamientos implementados, dentro de la cámara de flujo laminar [Figura 6], con el objetivo de evaluar el impacto de diferentes combinaciones de biorreguladores en el desarrollo de los explantes. Se designó el tratamiento denominado t0 como el grupo control, caracterizado por la ausencia de aplicación de agentes externos, con el fin de establecer una línea base para la comparación de efectos. Los tratamientos subsiguientes, identificados como t1 y t2, incorporaron distintos biorreguladores de crecimiento, cuya composición y concentración se especifican en la Tabla 2.

Cada conjunto de explantes fue etiquetado con su respectivo tratamiento, asegurando una investigación precisa y sistemática del efecto de los desinfectantes y biorreguladores en el desarrollo de los explantes de *M. rhopaloides*.



Figura 6

Trabajo dentro de la cámara de flujo laminar

Fuente: Los Autores, 2024

Tabla 2*Diseño experimental*

Tratamientos	Descripción	
	Desinfectantes	Reguladores hormonales
t0	--	--
t1	HIPOCLORITO DE SODIO [1,5 % NaClO]	6-BAP 1 mg/L + ANA [0,25 mg/L]
t2	HIPOCLORITO DE SODIO [2,0% NaClO]	6-BAP 1,5mg/L+ ANA [0,50 mg/L]
t1	AMONIO CUATERNARIO [1,5% AC]	6-BAP 0,5 mg/L + ANA [0,25 mg/L]
t2	AMONIO CUATERNARIO [2,0 % AC]	6-BAP 1 mg/L+ ANA [0,50 mg/L]

3.2.4 Cámara de crecimiento

Los explantes se trasladaron al cuarto de crecimiento, donde se controlaron las condiciones ambientales. Se mantuvo una humedad relativa constante de 80% y una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, junto con un ciclo de luz de 12 horas y oscuridad de 12 horas. Al cabo de 10 días, se procedió a la recolección y análisis de los datos para evaluar el progreso y la respuesta de los explantes bajo las condiciones experimentales establecidas.

3.3 Diseño experimental

La metodología seleccionada para esta tesis es un diseño experimental puro diseñado para investigar cómo diferentes tratamientos fitoreguladores afectan el crecimiento de explantes vegetales. Este enfoque implica una comparación directa entre dos grupos de explantes sometidos a distintos tratamientos. La recopilación de datos se realizará

prospectivamente, y el estudio tiene el propósito explicativo de comprender el fenómeno observado.

En el contexto de este estudio, las variables independientes son los tratamientos con diferentes concentraciones de fitorreguladores, mientras que las variables dependientes incluyen las tasas de crecimiento de los explantes y su nivel de contaminación. El grupo control estará formado por explantes que no están sujetos a tratamiento con fitorreguladores, contrastando con los grupos experimentales que sí lo están.

Para evaluar de manera objetiva el crecimiento y la pureza de los explantes, se adoptará un diseño de bloques completamente aleatorizados. Esta configuración experimental incorpora dos tipos de variables independientes: la condición inicial de los explantes ya sea recién recolectados o pretratados, y la naturaleza específica del tratamiento fitorregulador empleado.

La unidad experimental consistirá en un tubo de 10 ml de medio de cultivo MS y el explante vegetal correspondiente. El estudio se dividirá en dos protocolos distintos, cada uno aplicando un tipo de tratamiento fitorregulador, y se establecerán cuatro niveles de tratamiento con tres repeticiones para cada uno.

Se evaluarán dos variables de resultado: la contaminación, como un factor cualitativo, y la tasa de crecimiento de los explantes, como un factor cuantitativo. El grupo de control es esencial para determinar la influencia del tratamiento previo en los resultados de crecimiento. Todos estos elementos se analizarán meticulosamente conforme al diseño experimental planteado.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis estadístico

En el ámbito de esta investigación académica, el análisis estadístico de los datos se realizó empleando el software R en su versión 4.0.2, una herramienta de código abierto y de gran prestigio en el análisis estadístico. Esta elección metodológica asegura la aplicación de procedimientos analíticos rigurosos y actualizados, permitiendo así una exploración exhaustiva y fiable de los datos recabados durante el experimento. La implementación de R, con su amplia gama de paquetes y funciones estadísticas, facilita un análisis detallado y a la vez flexible, adecuándose a las necesidades específicas y a la naturaleza de los datos de la investigación presente.

Tabla 3

Distribución de los datos para el análisis estadístico

Tratamientos	Yemas contaminadas	Supervivencia	Fenolización	Número de tubos	Contaminación	Supervivencia	Fenolización
					%	%	%
t1 - NaClO	0	4	2	6	0,00	66,67	33,33
t1 - NaClO	1	4	2	6	16,67	66,67	33,33
t1 - NaClO	1	4	2	6	16,67	66,67	33,33
t2 - NaClO	1	5	1	6	16,67	83,33	16,67
t2 - NaClO	2	6	0	6	33,33	100,00	0,00
t2 - NaClO	2	3	3	6	33,33	50,00	50,00
t1 - AC	2	2	4	6	33,33	33,33	66,67
t1 - AC	2	3	3	6	33,33	50,00	50,00
t1 - AC	2	6	0	6	33,33	100,00	0,00
t2 - AC	2	5	1	6	33,33	83,33	16,67
t2 - AC	1	2	4	6	16,67	33,33	66,67
t2 - AC	1	2	4	6	16,67	33,33	66,67

4.1.2 Evaluación de la contaminación con el Protocolo 1. Hipoclorito de sodio

La Tabla 4 presenta los resultados obtenidos de la aplicación de dos tratamientos, denominados t1 y t2, en el cual el agente desinfectante fue hipoclorito de sodio. los valores fueron expresados en la variable respuesta porcentaje de contaminación.

Tabla 4

Evaluación del porcentaje de contaminación en explantes de M. rhopaloides empleando como agente desinfectante el hipoclorito de sodio [Protocolo 1]

Tratamientos	Contaminación [%]
t1	66,67
t1	33,33
t1	16,67
t2	33,33
t2	16,67
t2	16,67

Nota. *t1= Tween 20 - 10 min, etanol 70% - 1 min, 1,5 % NaClO - 10 min. t2= Tween 20 - 10 min, etanol 70% - 1 min, 2,0% NaClO - 20 min.

4.1.3 Evaluación de la distribución normal de los datos

Para la evaluación de la normalidad de la distribución de los datos de la variable respuesta contaminación se realizó mediante la prueba Shapiro-Wilk en la cual, con un α de 0,01, los resultados obtenidos fueron un valor $p = 0,211$, por ende, se asume que los datos presentaron distribución normal [Tabla 5].

Tabla 5

Resultados de la evaluación de la distribución normal de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk para la variable respuesta contaminación [Protocolo 1]

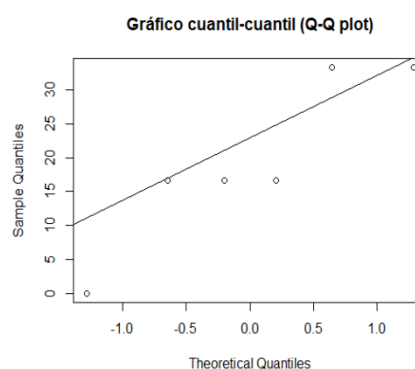
Variable	Shapiro-Wilk	Valor - p
Contaminación	0,86626	0,211

Nota. *Se utilizó un nivel de significancia $\alpha = 0,01$.

También se realizó el gráfico Cuantil-Cuantil en el cual se observa que los datos tuvieron una distribución cercana a la línea diagonal determinando que el conjunto de datos presentó una distribución normal [Figura 7].

Figura 7

Evaluación de la distribución normal de los datos mediante el gráfico Cuantil-Cuantil [Q-Q plot] para la variable respuesta contaminación [Protocolo 1]



4.1.4 ANOVA para la variable respuesta contaminación [Protocolo 1]

Mediante el modelo ANOVA con un nivel de significancia $\alpha = 0,01$ se evaluó si los tratamientos presentaron diferencias significativas. El valor p obtenido en el modelo ANOVA fue 0,101, esto sugiere que los tratamientos no presentaron diferencia estadística significativa [Tabla 6].

Tabla 6

Resultados del ANOVA para la variable respuesta contaminación [Protocolo 1]

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	valor - F	valor - p
Tratamientos	1	416,7	416,7	4,5	0,101
Residuales	4	370,4	92,6		

Nota. *El nivel de significancia utilizado fue $\alpha = 0,01$.

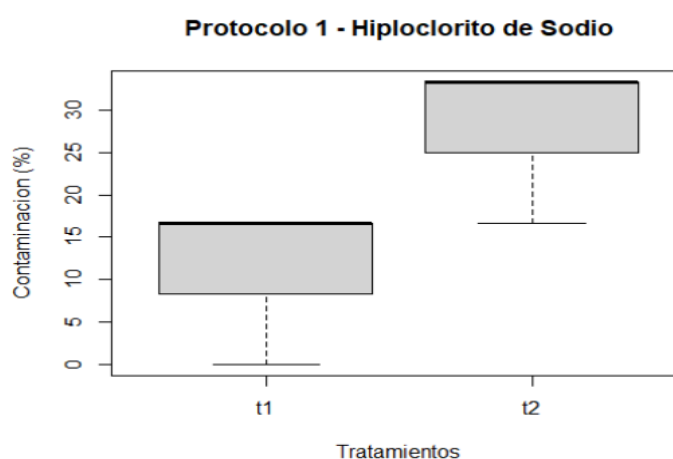
4.1.5 Diagrama de cajas y bigotes para la variable respuesta contaminación

[Protocolo 1]

A través de un diagrama de cajas y bigotes se observa que los datos de la variable respuesta contaminación [Protocolo 1] presentaron una distribución asimétrica con una baja dispersión y la mediana como medida de tendencia central se encuentra cercana al cuartil 3 [Q3], además, no se observaron datos atípicos [Figura 8].

Figura 8

Diagrama de cajas y bigotes para la variable respuesta contaminación



Nota. *t1= Tween 20 - 10 min, etanol 70% - 1 min, 1,5 % NaClO - 10 min. t2= Tween 20 - 10 min, etanol 70% - 1 min, 2,0% NaClO - 20 min.

4.2 Evaluación de la fenolización con el Protocolo 1. Hipoclorito de sodio

Con el fin de evaluar el proceso de fenolización en explantes de *M. rhopaloides*, se llevó a cabo un análisis comparativo de los datos experimentales mostrados en la Tabla 7.

Tabla 7

Evaluación del porcentaje de fenolización en explantes de M. rhopaloides empleando como agente desinfectante el hipoclorito de sodio [Protocolo 1]

Tratamientos	Fenolización [%]
t1	66,67
t1	66,67
t1	83,33
t2	66,67
t2	50,00
t2	83,33

Nota. *t1= Tween 20 - 10 min, etanol 70% - 1 min, 1,5 % NaClO - 10 min. t2= Tween 20 - 10 min, etanol 70% - 1 min, 2,0% NaClO - 20 min.

4.2.1 Evaluación de la distribución normal de los datos

Para la evaluación de la normalidad de la distribución de los datos de la variable respuesta fenolización, se realizó la prueba de Shapiro-Wilk, considerando un nivel de significancia de $\alpha = 0,01$, los resultados obtenidos fueron un valor $p = 0,4733$, por lo que, se asume que los datos presentan una distribución normal [Tabla 8].

Tabla 8

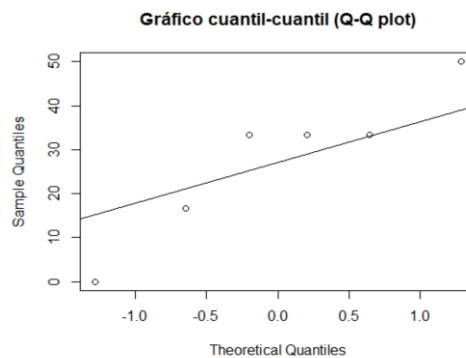
Resultados de la evaluación de la distribución normal de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk para la variable respuesta fenolización [Protocolo 1]

Variable	Shapiro-Wilk	valor- p
Fenolización	0,91546	0,4733

Además, se realizó un gráfico cuantil-cuantil [Q-Q plot] para visualizar la distribución de los datos correspondientes a la variable respuesta fenolización. La gráfica revela que los puntos tienden a alinearse con la línea diagonal, determinando que la distribución de los datos se asemeja a una distribución normal [Figura 9].

Figura 9

Evaluación de la distribución normal de los datos mediante el gráfico Cuantil-Cuantil [Q-Q plot] para la variable respuesta fenolización [Protocolo 1]



4.2.2 ANOVA para la variable respuesta de la fenolización [Protocolo 1]

Utilizando el modelo ANOVA con un nivel de significancia de $\alpha = 0,01$, se examinó la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos para la variable respuesta fenolización. El valor p obtenido fue de 0,492, lo que indica que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos según los datos presentados [Tabla 9].

Tabla 9

Resultados del ANOVA para la variable respuesta fenolización [Protocolo 1]

Fuente de Variación	d f	Suma de Cuadrados [SC]	Cuadrado Medio [CM]	Valor F	p-valor
Tratamientos	1	185,2	185,2	0,571	0,492
Residuales	4	1296,3	324,1		

Nota. El nivel de significancia utilizado fue $\alpha = 0,01$.

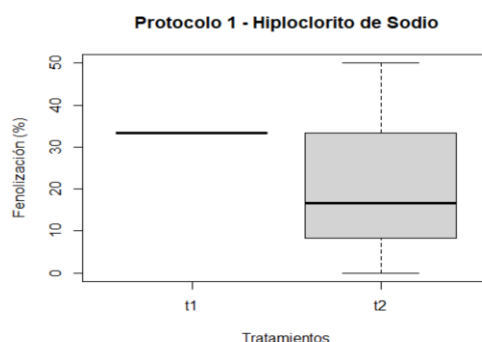
4.2.4 Diagrama de cajas y bigotes para la variable respuesta fenolización

[Protocolo 1]

A través de un diagrama de cajas y bigotes, se aprecia la distribución de los datos para la variable respuesta fenolización bajo el Protocolo 1 que utiliza hipoclorito de sodio. Los datos del tratamiento t1 presentan una dispersión relativamente uniforme, con una mediana cercana al primer cuartil [Q1], indicando una distribución asimétrica hacia los valores inferiores de fenolización. Por otro lado, los datos del tratamiento t2 muestran una mayor dispersión, como se evidencia por la amplitud de la caja y los bigotes. La mediana para t2 se sitúa aproximadamente en el centro de la caja, sugiriendo una distribución más simétrica. No se identifican datos atípicos en ninguno de los tratamientos [Figura 10].

Figura 10

Diagrama de cajas y bigotes para la variable respuesta fenolización



4.3 Evaluación de la supervivencia con el Protocolo 1. Hipoclorito de sodio

Para evaluar la supervivencia y comparar la eficacia de diferentes tratamientos. Se realizaron pruebas de normalidad, como la de Shapiro-Wilk, para validar el uso de pruebas paramétricas, y técnicas de análisis de varianza [ANOVA] para comparar grupos experimentales y de control. Los gráficos cuantil-cuantil [Q-Q] y de caja [box plots] ofrecen una visualización de la dispersión y tendencia de los datos [Tabla 10].

Tabla 10

Evaluación del porcentaje de supervivencia en explantes de M. rhopaloides empleando como agente desinfectante el hipoclorito de sodio [Protocolo 1]

Tratamientos	Supervivencia [%]
t1	66,67
t1	66,67
t1	66,67
t2	83,33
t2	100,00
t2	50,00

4.3.1 Evaluación de la distribución normal de los datos

Para la evaluación de la normalidad de la distribución de los datos de la variable respuesta supervivencia, se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk. Tomando un nivel de significancia de $\alpha = 0,01$, se obtuvo un valor p de 0,4733. En base a estos resultados, se asume que los datos siguen una distribución normal [Tabla 11].

Tabla 11

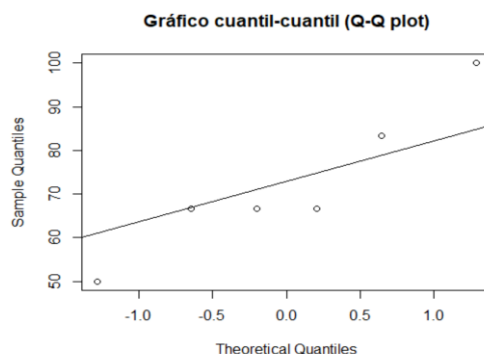
Resultados de la evaluación de la distribución normal de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk para la variable respuesta supervivencia [Protocolo 1]

Variable	Shapiro-Wilk	valor - p
Supervivencia	0,91546	0,4733

Además, se elaboró el gráfico cuantil-cuantil [Q-Q plot] para examinar la distribución de los datos de la variable respuesta supervivencia, revelando que los puntos se alinean cerca de la línea diagonal, lo que sugiere una distribución normal de los datos [Figura 11].

Figura 11

Evaluación de la distribución normal de los datos mediante el gráfico Cuantil-Cuantil [Q-Q plot] para la variable respuesta supervivencia [Protocolo 1]



4.3.2 ANOVA para la variable respuesta supervivencia [Protocolo 1]

Mediante el modelo ANOVA, con un nivel de significancia de $\alpha = 0,01$, se evaluaron las diferencias significativas entre los tratamientos en cuanto a la variable de respuesta supervivencia. Se obtuvo un valor p de 0,492, lo cual sugiere que no existen diferencias significativas estadísticamente entre los tratamientos, de acuerdo con los datos mostrados [Tabla 12].

Tabla 12

Resultados del ANOVA para la variable respuesta supervivencia [Protocolo 1]

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Valor F	valor - p
Tratamientos	1	185,2	185,2	0,571	0,492
Residuales	4	1296,3	324,1		

Nota. *Se utilizó un nivel de significancia de 0,01

4.3.3 Diagrama de cajas y bigotes para la variable respuesta supervivencia

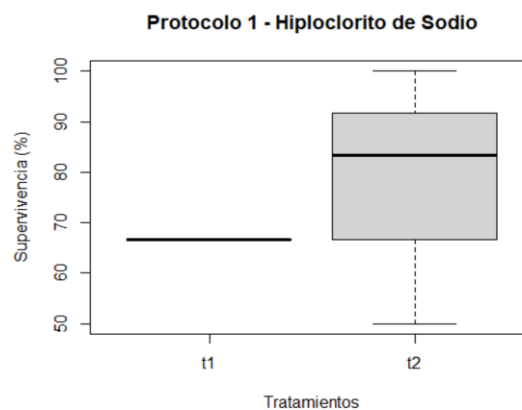
[Protocolo 1]

A través del diagrama de cajas y bigotes se observa que los datos correspondientes a la variable respuesta supervivencia manifiestan una distribución distinta entre sí. El tratamiento t1 evidencia una distribución con una menor dispersión, y una mediana

posicionada cerca del extremo inferior de la caja, lo que sugiere una asimetría hacia menores porcentajes de supervivencia. En contraste, el tratamiento t2 presenta una dispersión más amplia y una mediana más centrada, indicativa de una distribución más simétrica en torno a la mediana. En ambos tratamientos no se observan datos atípicos, lo que denota uniformidad en las medidas de supervivencia registradas [Figura 12].

Figura 12

Diagrama de cajas y bigotes para la variable respuesta supervivencia



4.4 Evaluación de la contaminación con el Protocolo 2. Amonio cuaternario

Se presenta los resultados de la aplicación de dos tratamientos t1 y t2, donde se utilizó amonio cuaternario como agente desinfectante. Los resultados se expresan como porcentaje de contaminación para cada uno de los tratamientos en explantes de *M. rhopaloides*, conforme al Protocolo 2 [Tabla 13].

Tabla 13

*Evaluación del porcentaje de contaminación en explantes de *M. rhopaloides* empleando como agente desinfectante amonio cuaternario [Protocolo 2]*

Tratamientos	Contaminación [%]
t1	66,67
t1	33,33
t1	16,67
t2	33,33
t2	16,67
t2	16,67

4.4.1 Evaluación de la distribución normal de los datos

Para la evaluación de la normalidad de la distribución de los datos de la variable respuesta contaminación se realizó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Estableciendo un $\alpha = 0,01$, los resultados indicaron un valor p de 0,03294, por lo que, se asume que los datos presentaron una distribución normal [Tabla 14].

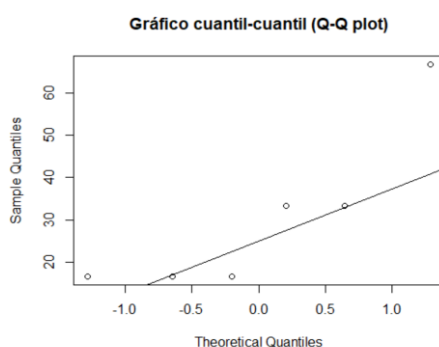
Tabla 14

Resultados de la evaluación de la distribución normal de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk para la variable respuesta contaminación [Protocolo 2]

Variable	Shapiro-Wilk	valor - p
Contaminación	0,77272	0,03294

Nota. *Se utilizó un nivel de significancia $\alpha = 0,01$.

Además, se realizó el gráfico Cuantil-Cuantil [Q-Q plot], donde se observa que los datos de la variable respuesta contaminación, bajo el Protocolo 2, se distribuyen siguiendo una alineación próxima a la línea diagonal. Esta alineación de los datos con la línea de referencia sugiere que la distribución de los datos presenta una distribución normal [Figura 13].

Figura 13**Evaluación de la distribución normal de los datos mediante el gráfico Cuantil-Cuantil [Q-Q plot] para la variable respuesta contaminación [Protocolo 2]****4.4.2 ANOVA para la variable respuesta contaminación [Protocolo 2]**

Mediante el modelo ANOVA con un nivel de significancia de $\alpha = 0,01$, se evaluó la presencia de diferencias significativas entre los tratamientos. El valor p obtenido de este análisis fue de 0,349, lo que indica que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos [Tabla 15].

Tabla 15

Resultados del ANOVA para la variable respuesta contaminación [Protocolo 2]

Fuente de Variación	Grados de Libertad [df]	Suma de Cuadrados [SC]	Cuadrado Medio [CM]	Valor F	valor - p
Tratamientos	1	416,7	416,7	1,125	0,349
Residuales	4	1481,5	370,4		

Nota. *El nivel de significancia utilizado fue $\alpha = 0,01$.

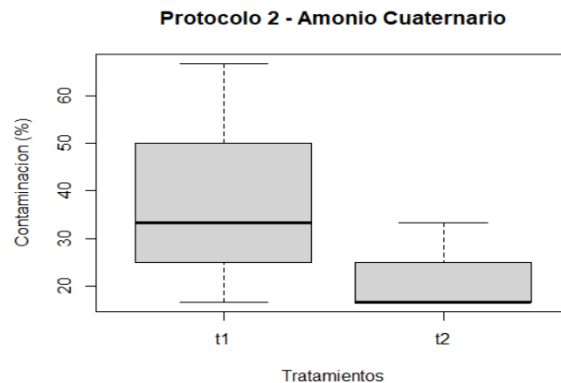
4.4.3 Diagrama de caja y bigotes para la variable respuesta contaminación [Protocolo 2].

A través del diagrama de cajas y bigotes, se observa la distribución de los datos de la variable respuesta contaminación [Protocolo 2]. Se observa que los datos del tratamiento t1 presentan una distribución con una dispersión relativamente mayor y una mediana que se sitúa hacia el centro de la caja, lo que sugiere una distribución simétrica. Por otro lado,

los datos para el tratamiento t2 muestran una dispersión reducida, con la mediana ubicada más cercana al cuartil inferior [Q1], implicando una ligera asimetría. Además, no se observaron datos atípicos [Figura 14].

Figura 14

Diagrama de cajas y bigotes para la variable respuesta contaminación



Nota. *t1= Tween 20 - 10 min, etanol 70% - 1 min, 1,5 % AC - 10 min. t2= Tween 20 - 10 min, etanol 70% - 1 min, 2,0% AC - 20 min.

4.5 Evaluación de la fenolización con el Protocolo 2. Amonio cuaternario

Con el fin de evaluar el proceso de fenolización en explantes de *M. rhopaloides*, se llevó a cabo un análisis comparativo de los datos experimentales mostrados en la Tabla 16.

Tabla 16

Evaluación del porcentaje de fenolización en explantes de M. rhopaloides empleando como agente desinfectante amonio cuaternario [Protocolo 2]

Tratamientos	Fenolización [%]
t1	66,67
t1	50,00
t1	0,00
t2	16,67
t2	66,67
t2	66,67

Nota. t1= Tween 20 - 10 min, etanol 70% - 1 min, 1,5 % AC - 10 min. t2= Tween 20 - 10 min, etanol 70% - 1 min, 2,0% AC - 20 min.

4.5.1 Evaluación de la distribución normal de los datos

Para la evaluación de la normalidad de la distribución de los datos de la variable respuesta fenolización del Protocolo 2, se realizó la prueba de Shapiro-Wilk, considerando un nivel de significancia de $\alpha = 0,01$, los resultados obtenidos fueron un valor $p = 0,05872$, por lo tanto, los datos cumplen con la distribución normal [Tabla 17].

Tabla 17

Resultados de la evaluación de la distribución normal de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk para la variable respuesta fenolización [Protocolo 2]

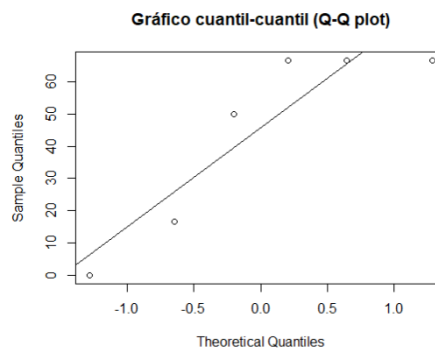
Variable	Shapiro-Wilk	valor-p
Fenolización	0,79995	0,05872

Además, se realizó un gráfico cuantil-cuantil [Q-Q plot] para visualizar la distribución de los datos correspondientes a la variable respuesta fenolización. La gráfica revela que los

puntos tienden a alinearse con la línea diagonal, determinando que la distribución de los datos se asemeja a una distribución normal [Figura 15].

Figura 15

Evaluación de la distribución normal de los datos mediante el gráfico Cuantil-Cuantil [Q-Q plot] para la variable respuesta fenolización [Protocolo 2]



4.5.2 ANOVA para la variable respuesta fenolización [Protocolo 2]

Empleando el modelo ANOVA con un nivel de significancia de $\alpha = 0,01$, se observó si existían diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos respecto a la variable respuesta fenolización. El valor p obtenido fue de 0,692, lo que indica que no hay diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos de acuerdo con los datos presentados [Tabla 18].

Tabla 18

Resultados del ANOVA para la variable respuesta fenolización [Protocolo 2]

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Valor F	valor-p
Tratamientos	1	185,2	185,2	0,182	0,692
Residuales	4	4074	1018,5		

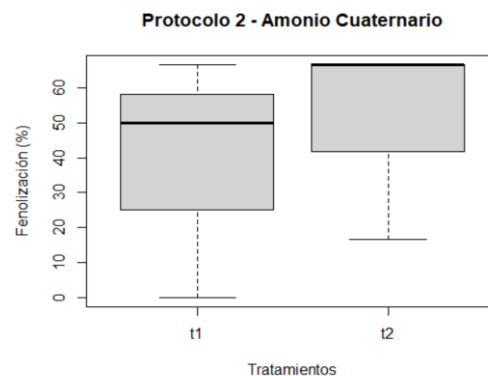
Nota. *El nivel de significancia utilizado fue $\alpha = 0,01$.

4.5.3 Diagrama de caja y bigotes para la variable respuesta fenolización [Protocolo 2]

A través del diagrama de cajas y bigotes, se puede observar la distribución de la variable respuesta fenolización aplicando el Protocolo 2 que utiliza amonio cuaternario. Los datos correspondientes al tratamiento t1 presentan una distribución con una mediana que se acerca al tercer cuartil [Q3], lo que puede indicar una ligera asimetría hacia valores más altos de fenolización. En contraste, el tratamiento t2 presentó una variabilidad significativa, como lo demuestra la extensión de la caja y los bigotes. Sin embargo, la mediana se ubica más cerca del centro de la caja, sugiriendo una distribución más equilibrada de los datos de fenolización. En ninguno de los tratamientos se detectan valores atípicos, lo cual es indicativo de la consistencia en las respuestas de fenolización observadas [Figura 16].

Figura 16

Diagrama de cajas y bigotes para la variable respuesta fenolización



4.6 Evaluación de la supervivencia con el Protocolo 2. Amonio cuaternario

Se presenta la evaluación del porcentaje de supervivencia en explantes de *M. rhopaloides* al utilizar amonio cuaternario como agente desinfectante, siguiendo el Protocolo 2 [Tabla 19].

Tabla 19

*Evaluación del porcentaje de supervivencia en explantes de *M. rhopaloides* empleando como agente desinfectante amonio cuaternario [Protocolo 2]*

Tratamientos	Supervivencia [%]
t1	33,33
t1	50,00
t1	100,00
t2	83,33
t2	33,33
t2	33,33

4.6.1 Evaluación de la distribución normal de los datos

Para determinar la normalidad en la distribución de los datos de la variable respuesta supervivencia, se realizó la prueba de Shapiro-Wilk. Con un nivel de significancia de $\alpha = 0,01$, los resultados indicaron un valor p de 0,05872. Dado que este valor es mayor que el nivel de significancia establecido, se considera que los datos cumplen con una distribución normal [Tabla 20].

Tabla 20

Resultados de la evaluación de la distribución normal de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk para la variable respuesta supervivencia [Protocolo 2]

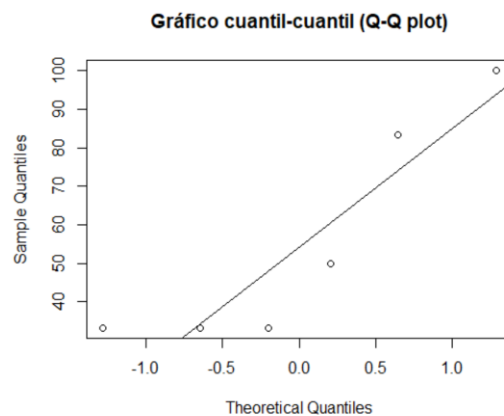
Variable	Shapiro-Wilk	valor - p
Supervivencia	0,79995	0,05872

Además, se realizó un gráfico cuantil-cuantil (Q-Q plot) para analizar la distribución de los datos asociados a la variable respuesta supervivencia dentro del Protocolo 2. El gráfico

muestra que los puntos se disponen cerca de la línea diagonal, lo que implica que la distribución de los datos tiende a ser normal [Figura 17].

Figura 17

Evaluación de la distribución normal de los datos mediante el gráfico Cuantil-Cuantil [Q-Q plot] para la variable respuesta supervivencia [Protocolo 2]



4.6.2 ANOVA para la variable respuesta supervivencia [Protocolo 2]

Empleando el modelo ANOVA, con un nivel de significancia de $\alpha = 0,01$, se determinó si existían diferencias significativas entre los tratamientos respecto a la variable respuesta supervivencia. El valor p resultante fue de 0,692, indicando que, según los datos presentados, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos [Tabla 21].

Tabla 21

Resultados del ANOVA para la variable respuesta supervivencia [Protocolo 1]

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Valor F	valor - p
Tratamientos	1	185,2	185,2	0,182	0,692
Residuales	4	4074	1018,5		

Nota. Se utilizó un nivel de significancia de 0,01.

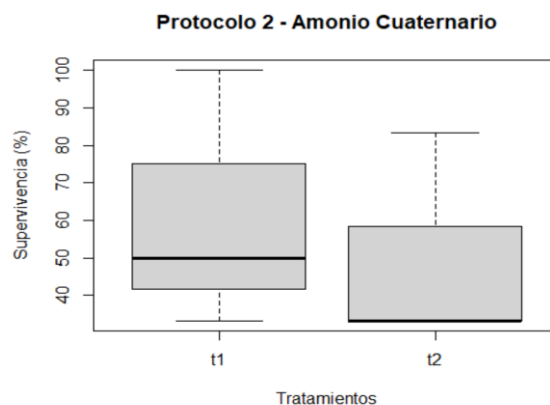
4.6.3 Diagrama de caja y bigotes para la variable respuesta supervivencia

[Protocolo 2]

A través del diagrama de cajas y bigotes se muestra la distribución de la variable respuesta supervivencia bajo el Protocolo 2. El tratamiento t1 tiene una dispersión algo menor, con una mediana cercana al cuartil superior, indicando una posible inclinación hacia porcentajes de supervivencia más elevados. En cambio, el tratamiento t2 presenta una mayor dispersión de los datos, aunque su mediana se encuentra más próxima al centro de la caja, lo que señala una distribución más simétrica. No se detectan valores atípicos en ninguno de los dos tratamientos, lo que sugiere una consistencia en las respuestas de supervivencia observadas en cada tratamiento [Figura 18].

Figura 18

Diagrama de cajas y bigotes para la variable respuesta supervivencia



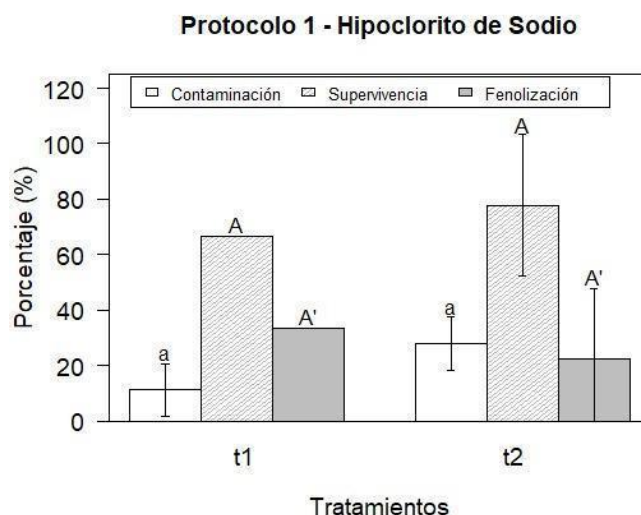
4.7 Comparación del Protocolo 1 en relación con la contaminación, supervivencia y fenolización

Se presentan los resultados del Protocolo 1, en el cual se trabajó con el agente desinfectante hipoclorito de sodio en el establecimiento *in vitro* de yemas de *M. rhopaloides*. El porcentaje promedio de contaminación, supervivencia y fenolización para el t1 fueron 11,11, 66,66, y 33,33%, respectivamente. Mientras que, para el t2 fueron 27,77, 77,77, y 22,22, respectivamente. Para las diferentes variables respuesta el ANOVA

no mostró diferencia significativa entre los tratamientos, contaminación [valor $P = 0,101$], supervivencia [valor $P = 0,492$], y fenolización [valor $P = 0,492$]. La contaminación, supervivencia y fenolización de los diferentes tratamientos en el establecimiento *in vitro* de yemas de *M. rhopaloides* Kunth. t1: NaClO 1,5% - 20 min, t2: NaClO 2% - 10 min. Los resultados son expresados como promedio del porcentaje \pm DS, $n = 3$ [Figura 19].

Figura 19

Gráfica de la contaminación, supervivencia y fenolización de los diferentes tratamientos con hipoclorito de sodio



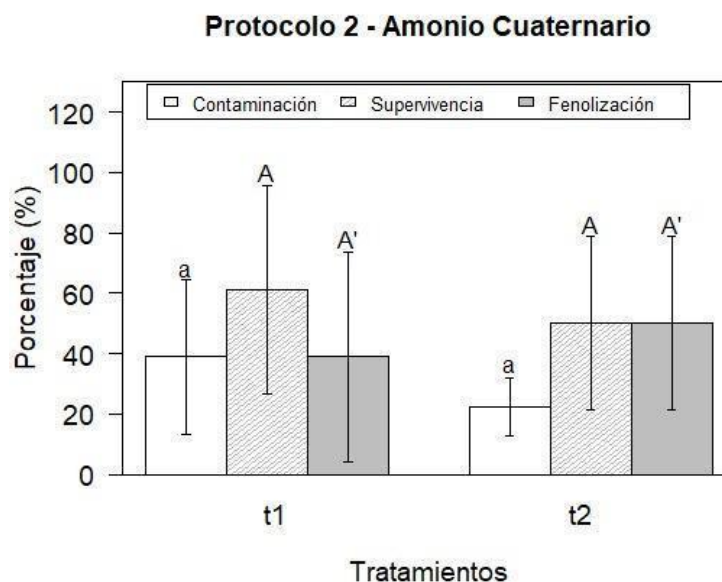
4.8 Comparación del Protocolo 2 en relación con la contaminación, supervivencia y fenolización

Se presentan los resultados del Protocolo 2, en el cual se trabajó con el agente desinfectante amonio cuaternario en el establecimiento *in vitro* de yemas de *M. rhopaloides*. El porcentaje promedio de contaminación, supervivencia y fenolización para el t1 fueron 38,88, 61,11, y 38,88%, respectivamente. Mientras que, para el t2 fueron 22,22, 50,00, y 50,00%, respectivamente. Para las diferentes variables respuesta el ANOVA no mostró diferencia significativa entre los tratamientos, contaminación [valor $P = 0,349$], supervivencia [valor $P = 0,692$], y fenolización [valor $P = 0,692$]. La

contaminación, supervivencia y fenolización de los diferentes tratamientos en el establecimiento *in vitro* de yemas de *M. rhopaloides* Kunth. El tratamiento 1 consistió en la aplicación de Amonio Cuaternario al 1,5% durante 20 minutos, mientras que el tratamiento 2 aplicó una concentración del 2% por un período de 10 minutos. Los resultados obtenidos se expresan como el promedio del porcentaje con su desviación estándar (\pm DS), basados en un $n = 3$ para cada tratamiento. [Figura 20].

Figura 20

Gráfica de la contaminación, supervivencia y fenolización de los diferentes tratamientos con Amonio cuaternario



4.9 Discusión

Este estudio se centró en comparar la efectividad de dos métodos de desinfección, utilizando hipoclorito de sodio [protocolo 1] y amonio cuaternario [protocolo 2], con hormonas 6-bencilaminopurina [BAP] y ácido naftalenacético [ANA], evaluando su impacto en aspectos críticos como la contaminación, fenolización y la supervivencia de los explantes vegetales. A pesar de que no se identificaron diferencias significativas en los niveles de contaminación entre ambos protocolos, se corroboraron los hallazgos de

Lab Associates (2021) sobre la eficacia del hipoclorito de sodio al 10-20% para la desinfección de explantes.

La escasez de estudios específicos sobre la micropropagación *in vitro* de *M. rhopaloides* Kunth dificulta la comparación de los resultados con estudios previos. Sin embargo, se notó una mayor tasa de supervivencia en los explantes tratados con hipoclorito de sodio, lo que sugiere una menor toxicidad residual comparada con el amonio cuaternario. Este resultado se alinea con la investigación de Jaramillo (2013), que también favoreció el uso del hipoclorito de sodio en concentraciones del 10% al 30%.

En contraste, Smith y colaboradores (2020) reportaron una mayor variabilidad en la supervivencia utilizando amonio cuaternario, lo que contrasta con nuestros hallazgos y sugiere que las respuestas a los protocolos de desinfección podrían ser más consistentes de lo que se pensaba anteriormente. Este aspecto es vital para los laboratorios que intentan estandarizar procedimientos de cultivo *in vitro*.

Además, la fenolización representa un desafío considerable en el cultivo de especies forestales debido a su alta concentración natural de polifenoles. El uso de antioxidantes emerge como una estrategia prometedora para disminuir este problema (Machado et al., 2020).

Sin embargo, es crucial mencionar las limitaciones de esta investigación, incluido el reducido tamaño de muestra y la duración del estudio, que, según Limaico Torres (2018), debería considerarse dado el tiempo de respuesta morfogénica de *M. rhopaloides* de entre seis y nueve meses.

En síntesis, este trabajo contribuye al conocimiento de los protocolos de desinfección en la Biotecnología Vegetal, destacando la necesidad de aplicar cuidadosamente el tiempo y la concentración de los agentes de descontaminación para preservar la integridad de los

explantos vegetales pues estos pueden presentar una gran capacidad desinfectante pero no una gran capacidad de supervivencia de los explantes. La confirmación de la eficacia tanto del hipoclorito de sodio como del amonio cuaternario y basados en los resultados, el tratamiento 2 con hipoclorito de sodio [2% NaClO - 10 min] parece ser la mejor alternativa. A pesar de presentar una tasa de contaminación algo más alta que su contraparte, ofrece la mayor tasa de supervivencia [77,77%] con una reducción significativa en la fenolización [22,22%]. Este balance es crucial en la micropropagación *in vitro*, donde la prioridad es maximizar la supervivencia de los explantes manteniendo bajos los niveles de fenolización y contaminación.

Aunque el ANOVA no mostró diferencias significativas entre tratamientos dentro de cada protocolo, lo que sugiere que las variaciones no son estadísticamente significativas, la elección práctica se inclina hacia el tratamiento que ofrece el mejor balance entre los parámetros evaluados, especialmente en ausencia de diferencias estadísticas significativas. Por lo tanto, el tratamiento con hipoclorito de sodio al 2% por 10 minutos es recomendable para futuras aplicaciones basadas en estos criterios para mejorar los resultados en micropropagación de la especie *M. rhopaloides*.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

La comparación de los dos protocolos de micropropagación para *Myrcianthes rhopaloides* Kunth no mostró diferencias estadísticamente significativas en cuanto a contaminación, fenolización y supervivencia de los explantes. Sin embargo, el tratamiento con hipoclorito de sodio al 2% por 10 minutos [Protocolo 1, Tratamiento 2] mostro una tendencia a presentar una mayor tasa de supervivencia y menor fenolización en comparación con los otros tratamientos realizados. Estos hallazgos indican que, aunque estadísticamente equivalentes, desde un punto de vista práctico, el Protocolo 1, Tratamiento 2 podría considerarse más eficiente para la micropropagación de *M. rhopaloides* Kunth.

La revisión bibliográfica realizada proporcionó un marco comparativo esencial para la interpretación de los resultados. Aunque los estudios previos son limitados para *M. rhopaloides* Kunth, las comparaciones sugieren que la efectividad del hipoclorito de sodio como desinfectante es consistente con la literatura, destacando su utilidad en la disminución de la fenolización sin comprometer la supervivencia.

Los experimentos realizados en laboratorio han permitido un análisis detallado del crecimiento y desarrollo de las yemas de *M. rhopaloides* Kunth. Los protocolos aplicados han proporcionado insights valiosos sobre la importancia de equilibrar la concentración y el tiempo de exposición de los agentes desinfectantes para maximizar la viabilidad de los explantes.

El análisis estadístico exhaustivo ha confirmado que a pesar de la ausencia de diferencias estadísticas significativas en el análisis ANOVA, las tendencias observadas orientan hacia una recomendación práctica del uso del hipoclorito de sodio al 2% por 10 minutos. Se

subraya la necesidad de replicar estos hallazgos con tamaños de muestra mayores y una duración extendida del estudio para confirmar las tendencias observadas.

5.2 Recomendaciones

Para encontrar los parámetros ideales para la micropropagación de *Myrcianthes rhopaloides* Kunth, se recomienda emplear plantas que se hayan germinado *in vitro* o que sean de viveros donde se pueda establecer la calidad de la planta donadora como punto de partida. Este método proporciona un material vegetal libre de contaminantes, lo cual es fundamental para mejorar la eficiencia de las técnicas de micropropagación aplicadas.

Para avanzar en la optimización de los protocolos de micropropagación *in vitro* de *M. rhopaloides* Kunth, se recomienda realizar estudios adicionales que permitan refinar las metodologías actuales. Es crucial investigar el impacto de variadas condiciones de micropropagación en esta especie, centrándose especialmente en determinar las concentraciones óptimas y las combinaciones de agentes desinfectantes más efectivas para su manipulación.

Se aconseja evaluar la eficacia de distintos agentes desinfectantes, examinando una amplia gama de concentraciones y tiempos de exposición para discernir las condiciones más favorables. Paralelamente, la investigación sobre el empleo de diversos reguladores hormonales podría contribuir significativamente a la mejora del establecimiento *in vitro* de las yemas, minimizando al mismo tiempo los riesgos de contaminación.

Además, para potenciar el establecimiento *in vitro* de *M. rhopaloides* Kunth, se propone incrementar el tiempo de exposición con los agentes desinfectantes. Este enfoque facilitaría un desarrollo más robusto y una mejor aclimatación de las yemas al ambiente

in vitro. Es imperativo implementar un monitoreo continuo que no solo permita evaluar el progreso del crecimiento de las yemas, sino también detectar y abordar de manera temprana cualquier incidencia de contaminación.

Estas recomendaciones buscan no solo perfeccionar los protocolos existentes sino también expandir el conocimiento sobre las condiciones idóneas para la micropropagación eficaz de *M. rhopaloides* Kunth, contribuyendo así al avance de la Biotecnología Vegetal.

6 REFERENCIAS

1. Carvalho, S. D., Ortega, M., Orellana, M., Rodríguez, M., Folta, K. M., & Torres, M. de L. (2021). *In vitro* propagation of the Amazonian medicinal plant guayusa (*Ilex guayusa*) and effects of light in the growth and development of this shade-tolerant plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 147(3), 503-517. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02142-y>
2. Curipoma, S., Cevallos, D., & Pérez, Á. J. (2018). Estructura florística del Bosque Andino. Ecuador. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 39(2), Article 2. <https://doi.org/10.26807/remcb.v39i2.648>
3. Brondani, G. E., Oliveira, L. S. de, Bergonci, T., Brondani, A. E., França, F. A. M., Silva, A. L. L. da, & Gonçalves, A. N. (2013). Esterilização química do meio de cultura: Uma alternativa de baixo custo para o estabelecimento *in vitro* de plantas. *Scientia Forestalis*, 41, 257-264.
4. Diniz, P. R. da S., Rispoli, R. G., Minozzo, M. M., Jobim, L. H., Junges, M., & Stefenon, V. M. (2014). A regenerative route for *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) through *in vitro* germination and micropropagation. *Annals of Forest Research*, 57(1), 39-45. <https://doi.org/10.15287/afr.2014.179>
5. Echenique, V. (2017). Cultivo de tejidos vegetales.
6. Enriquez, P. J., Aguilar, P. B., Espín, L. H., Zambrano, A. V., & Vargas, C. C. (2020). Propagation *in vitro* of Quishuar (*Buddleja incana* Ruiz & Pav). *Granja*, 31(1), 74-84. <https://doi.org/10.17163/lgr.n31.2020.05>
7. Espinosa, A. (2021). Composición de Myrcianthes. Química y Biodiversidad—
Wiley Online Library.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cbdv.200890120>

8. Galíndez, R. (2020). Biotecnología vegetal y cultivo de plantas *in vitro*. Recuperado de https://tecna.com.br/es/blog/327_biotecnologia_vegetal_y_cultivo_de_plantas_in_vitro
9. Granados, C., Yáñez, X., & Acevedo, D. (2014). Evaluación de la actividad antioxidante de *Myrcianthes rhopaloides*. *información tecnológica*, 25(3), 11-16. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642014000300003>
10. Hernández, S., & Pérez, A. (2019). Avances en la propagación *in vitro* de Cactaceae. *Plant Biotechnology Reports*, 13(3), 210-220. <https://doi.org/10.1007/s11816-019-00550-x>
11. Jaramillo, M.A. (2013). Disinfection treatments for the *in vitro* propagation of *Myrcianthes*. *Journal of Plant Sciences*, 8(3), 102-108.
12. Lab Associates. (2021). Sodium hypochlorite sterilization for plant tissue culture. lab associates.
13. Lazo, M., Troncoso, R., Tiznado, M., Martínez, M., Vargas, I., Islas, M., & Rivera, M. (2016). Surface disinfection procedure and *in vitro* regeneration of grapevine (*Vitis vinifera* L.) axillary buds. *SpringerPlus*, 5(1), 240. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2081-0>
14. Levitus, D. G., Echenique, D. V., Rubinstein, D. C., & Hopp, D. E. (2019). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*.
15. Limaico Torres, D. E. (2018). Evaluación de métodos de desinfección y control de la fenolización en semillas de Arrayán (*Myrcianthes rhopaloides*) para la germinación “*in vitro*” en Ibarra, Ecuador [Tesis de pregrado, Universidad Técnica del Norte, Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales, Escuela de Ingeniería en Biotecnología].

16. López, N., & Galvis, S. (2020). Área de restauración ecológica del bosque andino. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.2294.31044>
17. Loyola-Vargas, V. M., & Ochoa-Alejo, N. (Eds.). (2018). Plant Cell Culture Protocols (Vol. 877). Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-818-4>
18. Machado, J. S., Degenhardt, J., Maia, F. R., & Quoirin, M. (2020). Micropropagation of *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg (Myrtaceae), a medicinal tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Trees - Structure and Function*, 34(3), 791-799. <https://doi.org/10.1007/s00468-020-01958-z>
19. Maldonado, M. E., & Dacarro, C. (2020). Análisis de la composición de *Myrcianthes rhopaloides* (Kunth in H.B.K.) McVaugh, Myrtaceae, y evaluación de su actividad biológica. *La Granja*, 6(2), 17. <https://doi.org/10.17163/lgr.n6.2020.03>
20. Nuñez, C., & Ortega, D. (2015). Efecto de auxinas en la formación de raíces en cultivos *in vitro* de *Heliconia* spp.. *Tropical Plant Journal*, 7(2), 95-102. <https://doi.org/10.3456/tpj.2015.0720>
21. Ortega, E., & Serrano, M. (2020). Manuales de laboratorio: Técnicas de micropropagación de plantas. Editorial Agroindustrial.
22. Putri, A., Leksono, B., Windyarini, E., & Hasnah, T. (2019). Tissue culture sterilization of *Callophylum inophyllum*. *AIP Conference Proceedings*, 2120(July 2016), 30001. <https://doi.org/10.1063/1.5115608>
23. Teixeira da Silva, J.A. (2012). Disinfection in plant tissue culture: Theory and practice. *Propagation of Ornamental Plants*, 12(2), 92-120.
24. Teixeira, J., Kulus, D., Zhang, X., Zeng, S., Ma, G., & Piqueras, A. (2016). Desinfección de explantes para cultivo de tejido de azafrán (*Crocus sativus*).

- Environmental and Experimental Biology, 14(4), 183–198.
<https://doi.org/10.22364/eeb.14.25>
25. Teixeira, J., Winarto, B., Dobránszki, J., Cardoso, J., & Zeng, S. (2016). Desinfección de tejidos para preparación de cultivo *in vitro* de *Dendrobium*. *Folia Horticulturae*, 28(1), 57–75. <https://doi.org/10.1515/fhort-2016-0008>
26. Vargas, O., & Castro, L. (2016). *Fundamentos de cultivo in vitro: De la teoría a la práctica*. Editorial Botánica Moderna.
27. Walker, J. M. (s. f.). *methods in molecular biology*TM. Recuperado de <http://www.springer.com/series/7651>