



UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CUENCA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS

AGROPECUARIAS

CARRERA DE AGRONOMÍA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE CUATRO COMBINACIONES
HORMONALES, DOS CONCENTRACIONES DE MEDIO EN LA
MICROPROPAGACIÓN *IN VITRO* DE TRES CULTIVARES DE
ANTURIO (*Anthurium andreanum*)**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO**

AUTOR: FABRICIO IVAN GUZHÑAY LEON

DIRECTOR: ING. JUAN CARLOS GONZALEZ ROJAS, PH. D.

CUENCA - ECUADOR

2024

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS

AGROPECUARIAS

CARRERA DE AGRONOMÍA

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE CUATRO COMBINACIONES
HORMONALES, DOS CONCENTRACIONES DE MEDIO EN LA
MICROPROPAGACIÓN *IN VITRO* DE TRES CULTIVARES DE ANTURIO

(Anthurium andreanum)

**TRABAJO DE TITULACIÓN O PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO**

AUTOR: FABRICIO IVAN GUZHÑAY LEON

DIRECTOR: ING. JUAN CARLOS GONZALEZ ROJAS, PH. D.

CUENCA - ECUADOR

2024

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO



Declaratoria de Autoría y Responsabilidad

Fabricio Ivan Guzhñay Leon portador de la cédula de ciudadanía N° **0104973714**. Declaro ser el autor de la obra: “**Evaluación del efecto de cuatro combinaciones hormonales, dos concentraciones de medio en la micropropagación *in vitro* de tres cultivares de Anturio (*Anthurium andreanum*)**”, sobre la cual me hago responsable sobre las opiniones, versiones e ideas expresadas. Declaro que la misma ha sido elaborada respetando los derechos de propiedad intelectual de terceros y eximo a la Universidad Católica de Cuenca sobre cualquier reclamación que pudiera existir al respecto. Declaro finalmente que mi obra ha sido realizada cumpliendo con todos los requisitos legales, éticos y bioéticos de investigación, que la misma no incumple con la normativa nacional e internacional en el área específica de investigación, sobre la que también me responsabilizo y eximo a la Universidad Católica de Cuenca de toda reclamación al respecto.

Cuenca, **23 de abril de 2024**

F:

Fabricio Ivan Guzhñay Leon

C.I. 0104973714

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por Fabricio Ivan Guzhñay Leon, bajo mi supervisión.



Firmado
digitalmente por
JUAN CARLOS
GONZALEZ
ROJAS
Fecha: 2024.04.15
13:35:40 -05'00'

Juan Carlos González Rojas
DIRECTOR

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por guiarme por el buen camino donde nos encontramos con obstáculos que aparentar ser difíciles, pero él te da la fuerza y el ánimo para superarlos.

A mi director de Tesis el profesor Juan Carlos Gonzalez por aceptarme y darme recomendaciones para realizar esta tesis, agradezco su esfuerzo, dedicación y apoyo en la realización.

A la magister Nube del Rocío Minchala Buestán por ayudarme en la realización de la parte práctica, que con su experiencia supo guiarme en el momento de realizar las actividades destinadas a la parte experimental del trabajo.

A todos los que conforman el Laboratorio de Principios Activos y Seguridad Alimentaria, en especial al técnico Bq. Jorge Córdova quien me brindo todos los materiales necesarios para la realización de este trabajo y al personal del Laboratorio de Microbiología, en especial a la técnica Bq. María del Carmen Calle; una persona atenta, respetuosa, amigable y profesional que siempre me brindo su apoyo cuando lo necesite.

A mi madre que siempre me brindo su amor incondicional para que llegue a ser un hombre de bien.

Agradezco a mis hermanos y en especial a mi hermana Gabriela que cada día lucha por seguir adelante en todo lo que se propone.

DEDICATORIA

A mi madre y a mi padre por alentarme a ser un profesional y un hombre de bien, a mi enamorada por ser mi compañera incondicional brindándome sus consejos cuando más lo necesite, y a toda mi familia por darme ánimos en los buenos y malos momentos.

ÍNDICE

CERTIFICACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS	5
DEDICATORIA	6
RESUMEN.....	13
ABSTRACT.....	14
1.INTRODUCCIÓN.....	15
2. OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo General	17
2.2 Objetivos específicos	17
3. MARCO TEÓRICO.....	18
3.1 Género <i>Anthurium</i>	18
3.2 Cultivares de <i>Anthurium andreanum</i>	18
3.3 Descripción botánica.....	18
3.4 Hábitat en que se desarrolla el <i>Anthurium</i>	19
3.5 Plagas y enfermedades	19
3.6 Métodos de propagación	19
3.6.1 Propagación sexual	19
3.6.2 Propagación asexual	20
3.6.3 Propagación <i>in vitro</i>	20
3.6.3.1 Fase 0: Selección de la planta madre	20
3.6.3.2 Fase 1: Establecimiento del cultivo	20
3.6.3.3 Fase 2: Multiplicación.....	21
3.6.3.4 Fase 3: Enraizamiento	21
3.6.3.5 Fase 4: Aclimatización	21
3.7 Explante	21
3.8 Protocolo de desinfección.....	22
3.9 Condiciones ambientales.....	22
3.10 Medio de cultivo y sus componentes.....	22
3.10.1 Macronutrientes y micronutrientes.....	22
3.10.2 Vitaminas.....	23
3.10.3 Azúcares.....	23
3.10.4 Agentes gelificantes	24
3.10.5 Agua.....	24
3.11 El pH.....	24

3.12 Reguladores de crecimiento (RC)	24
3.12.1 Auxinas	24
3.12.2 Citoquininas.....	25
3.12.3 Giberelinas	25
3.13 Antioxidantes	25
3.14 Medios de cultivo usados en la micropropagación <i>in vitro</i>	26
3.14.1 Medio de cultivo Murashige y Skoog (MS)	26
3.14.2 Medio de cultivo Nitsch y Nitsch (NN)	26
3.15 Métodos de micropropagación de plantas	26
3.15.1 Cultivo de meristemas.....	26
3.15.2 Organogénesis	27
3.15.2.1 Organogénesis directa	27
3.15.2.2 Organogénesis indirecta	28
3.15.3 Embriogénesis somática	28
4. MATERIALES Y MÉTODOS	29
4.1 Localización del ensayo.....	29
4.2 Materiales.....	29
4.2.1 Material biológico	29
4.2.2 Utensilios	29
4.2.3 Equipos.....	30
4.2.4 Reactivos.....	31
4.3 Métodos.....	31
4.4. Fase experimental para el objetivo 1.....	32
4.4.1. Fase de campo.....	32
4.4.2 Fase de laboratorio	32
4.4.3 Tratamientos evaluados en el primer objetivo	32
4.4.4 Variables a medir en el primer objetivo.....	34
4.4.4.1 Porcentaje de contaminación a los 5, 15 y 30 días después de la siembra (DDS)	34
4.4.4.2 Porcentaje de pardeamiento a los 5, 15 y 30 DDS	34
4.5. Fase experimental para el objetivo dos.....	35
4.5.1 Medio de cultivo	35
4.5.2 Tratamientos.....	36
4.5.3 Variables a medir.....	36
4.5.3.1 Formación de callo	36
Grado del callo	37

4.5.3.2 Formación de brotes	38
4.5.4 Condiciones ambientales	38
4.5.5 Análisis estadístico	38
5. RESULTADOS	39
5.1 Porcentaje de Contaminación.....	39
5.1.1 Porcentaje de contaminación a los 5 DDS.....	39
5.1.2 Porcentaje de contaminación a los 15 DDS.....	40
5.1.3 Porcentaje de contaminación a los 30 DDS.....	40
5.2 Porcentaje de pardeamiento.....	41
5.2.1 Pardeamiento a los 5 DDS	41
5.2.2 Pardeamiento a los 15 DDS	42
5.2.3 Pardeamiento de los explantes a los 30 DDS.....	42
5.3 Medio de cultivo al 100%.....	44
5.4 Medio de cultivo al 50%	44
5.5 Formación de Callo	44
Grado del callo	47
5.6 Número de brotes	48
6. DISCUSIÓN	51
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	54
7.1 Conclusiones.....	54
7.2 Recomendaciones	54
8. Bibliografía	55
9. ANEXOS.....	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Taxonomía de la especie <i>A. andreanum</i>	18
Tabla 2 Soluciones desinfectantes usadas por diferentes autores en la micropropagación de <i>A. andreanum</i> con el uso de diversos explantes	23
Tabla 3 Utensilios usados en el trabajo	29
Tabla 4 Equipos usados para la micropropagación de los tres cultivares de <i>A. andreanum</i>	30
Tabla 5 Lista de reactivos usados en la micropropagación in vitro de tres cultivares de <i>A. andreanum</i> (Blanco, Rosa y Naranja).....	31
Tabla 6 Protocolos evaluados en la desinfección de los fragmentos de hoja proveniente de tres cultivares <i>A. andreanum</i>	33
Tabla 7 Combinaciones hormonales usadas en el trabajo.....	37
Tabla 8 Respuesta de los explantes de <i>A. andreanum</i> en la variación de la combinación hormonal.....	45
Tabla 9 Efectos de las combinaciones hormonales en el número de brotes a partir de segmentos foliares de <i>A. andreanum</i> cv. Blanco, Rosa y Naranja.	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Partes y desarrollo vegetativo de <i>A. andreaum</i>	19
Figura 2 Diversos procesos de micropropagación in vitro de plantas	27
Figura 3 Cultivares de <i>Anthurium andreaum</i> usados para la micropropagación in vitro.	30
Figura 4 Características del material vegetal utilizado en la micropropagación in vitro de los tres cultivares de <i>A. andreaum</i>	33
Figura 5 Desarrollo de los protocolos de desinfección de los explantes provenientes de hoja de <i>A. andreaum</i>	34
Figura 6 Presencia de microorganismos contaminantes encontrados en los diferentes ensayos.....	35
Figura 7 Escala porcentual del nivel de pardeamiento u oxidación exhibida en los explantes de hojas de <i>A. andreaum</i> cv. Blanco, Rosa y Naranja.	36
Figura 8 Escala de formación de callo alrededor del explante de hoja de <i>A. andreaum</i>	37
Figura 9 Categorización del callo en los explantes.....	38
Figura 10 Efecto principal de dos Protocolos de Desinfección sobre la variable de respuesta porcentaje de contaminación de explantes de hojas de tres cultivares de <i>A. andreaum</i> , a los 5 DDS usando medio de cultivo semisólido.	39
Figura 11 Efecto principal de dos Protocolos de Desinfección sobre la variable de respuesta porcentaje de contaminación de explantes de hojas de tres cultivares de <i>A. andreaum</i> , evaluado a los 15 DDS usando medio de cultivo semisólido	40
Figura 12 Efecto principal de dos Protocolos de Desinfección sobre la variable de respuesta porcentaje de contaminación de explantes de hojas de tres cultivares de <i>A. andreaum</i> , evaluado a los 30 DDS usando medio de cultivo semisólido.	41
Figura 13 Efecto principal o promedio de dos Protocolos de Desinfección en el porcentaje de pardeamiento de explantes de hojas de tres cultivares de <i>A. andreaum</i> a los 5 DDS en medio de cultivo semisólido.	42
Figura 14 Efecto principal o promedio de dos Protocolos de Desinfección en el porcentaje de pardeamiento de explantes de hojas de tres cultivares de <i>A. andreaum</i> a los 15 DDS en medio de cultivo semisólido.	43
Figura 15 Efecto principal o promedio de dos Protocolos de Desinfección en el porcentaje de pardeamiento de explantes de hojas de tres cultivares de <i>A. andreaum</i> a los 30 DDS en medio de cultivo semisólido.	43
Figura 16 Explantes muertos en el medio de cultivo MS al 100%.....	44
Figura 17 Formación de callos en explantes de segmentos de hojas de <i>A. andreaum</i> con el tratamiento 3, utilizando medio de cultivo MS al 50% a los 75 DDS.	45
Figura 18 Interacción de primer orden entre los factores en estudio Combinación de biorreguladores y tres cultivares de <i>A. andreaum</i> a los 90 DDS en medio de cultivo MS al 50%, en la variable de respuesta porcentaje formación de callo.....	46
Figura 19 Grado de callo formado en los explantes de hoja de <i>A. andreaum</i> cv. Blanco, Rosa y Naranja.....	47
Figura 20 Interacción de primer orden entre los factores en estudio Combinación de biorreguladores y tres cultivares de <i>A. andreaum</i> a los 90 DDS en medio de cultivo MS al 50%, en la variable de respuesta número de brotes.	49
Figura 21 Brotes formados a partir de segmentos de hojas de <i>A. andreaum</i> , usando el tratamiento tres.....	50

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A: Lista de componentes que contienen los medios de cultivo Murashige y Skoog con vitaminas de Gamborg B5 (MS) y el medio Nitsch y Nitsch (NN)	59
Anexo B Análisis estadístico.....	61
Anexo C Resumen fotográfico del proceso realizado para la micropropagación in vitro de <i>A. andreanum</i> a partir de segmentos foliares	64

RESUMEN

Anthurium andreanum es una planta ornamental de gran popularidad y aceptación en el sector florícola, por la forma de su follaje y flores vistosas, lamentablemente, los métodos de propagación convencional por vía sexual y asexual no son prácticos para conseguir una multiplicación masiva de esta especie. Por lo mencionado, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de cuatro combinaciones hormonales, dos concentraciones de medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) en la micropropagación *in vitro* de *A. andreanum* cultivar (cv.) Blanco, Rosa y Naranja. Para ello, se probaron dos protocolos de desinfección de explantes a partir de hojas, el primer tratamiento consistió en, Etanol al 70% x 30 s, NaClO al 0.5% x 15 min, el segundo tratamiento fue Etanol al 70% x 1 min, NaClO al 1 y 0.5%, por 5 y 15 min, respectivamente; obteniendo como resultado que el protocolo de desinfección uno presentó niveles tolerables de contaminación (20.04%) y pardeamiento (36.33%) en comparación con el protocolo dos que mostró niveles exuberantes de pardeamiento (97,11%). El medio de cultivo óptimo para la micropropagación de *A. andreanum* de explantes provenientes de hojas, fue MS al 50% suplementado con 0.5 mg/L⁻¹ de TDZ y 0.2 mg/L⁻¹ de 2-4 D. El cv. Rosa exhibió un 90% formación de callo y 8.5 brotes/explante, el cv. Naranja 88.3% de callo y 3 brotes/explante, y finalmente el cv. Blanco solo presentó formación de callo 2 %. En futuras investigaciones, se recomienda probar concentraciones bajas de Kinetina y Acido Naftalenacético en cv. Blanco.

Palabras claves: *Anthurium andreanum*, Organogénesis indirecta, cultivo *in vitro*, callogénesis

ABSTRACT

Anthurium andreanum is an ornamental plant of great popularity and acceptance in the floricultural sector due to the shape of its foliage and showy flowers. Unfortunately, conventional sexual and asexual propagation methods are not practical to achieve massive multiplication of this species. Therefore, this research aimed to evaluate the effect of four hormonal combinations, two concentrations of Murashige and Skoog (MS) culture medium, on the *in vitro* micropropagation of White, Pink, and Orange *A. andreanum* cultivar (cv.). In consequence, two protocols for disinfection of explants from leaves were tested; the first treatment constituted of 70% Ethanol for 30sec, 0.5% NaClO for 15 min; the second treatment was 70% Ethanol for 1 min, 1 and 0.5% NaClO, for 5 and 15 min respectively. The result was that disinfection protocol number one presented tolerable levels of contamination (20.04%) and browning (36.33%) compared to protocol number two, which showed exuberant levels of browning (97.11%). The optimal culture medium for the micropropagation of *A. andreanum* of explants from leaves was 50% MS supplemented with 0.5 mg/L⁻¹ of TDZ and 0.2 mg/L⁻¹ of 2-4 D. The Pink cv. exhibited 90% callus formation and 8.5 shoots/explant, the Orange cv. showed 88.3% callus and 3 shoots/explant, and finally, the White cv. only presented 2% callus formation. In future research, it is recommended to test low concentrations of Kinetin and Naphthaleneacetic Acid in White cv.

Keywords: *Anthurium andreanum*, indirect organogenesis, *in vitro* culture, callogenesis

1.INTRODUCCIÓN

El género *Anthurium* pertenece a la familia *Araceae*, abarca especies ornamentales altamente apreciadas tanto en maceta como en flor de corte, por su espectacular follaje y colores extravagantes de sus flores. Las especies con mayor demanda dentro de este género son *A. andreaum* Lind, *A. scherzerianum*, *A. crystallinum*, *A. cubense* y *A. recusatum* (Hernández, 2004), destacándose dentro de este grupo *A. andreaum* por ser la planta más cultivada y vendida (López *et al.*, 2013; Ordaz *et al.*, 2015; Saptaro *et al.*, 2017; Srimoot y Padsri, 2018).

Los países que se dedican a la exportación del Anturio son: Holanda (68%), Colombia (16%), Taiwán, Singapur, Tailandia y otros lo restante (López *et al.*, 2013). Los principales destinos del anturio son Europa, Japón y Estados Unidos. En el periodo enero-junio 2018, EE.UU. importó una cantidad de 40 mil unidades de anturios desde Ecuador, con un crecimiento en la importación del 149% con respecto al mismo periodo del año anterior (Expoflores, 2019). Anthura es una de las empresas holandesas que distribuye a 70 países diversos genotipos de esta especie (Anthura, 2015).

Las diferentes especies del género *Anthurium* presentan problemas en su propagación convencional tanto sexual como asexual, por su baja cantidad y rápida pérdida de viabilidad de sus semillas ya que es un híbrido estricto, además provoca descendientes con características distintas del progenitor (Folgozo *et al.*, 2007; Hernández, 2004); y en cambio, la reproducción asexual por división genera una baja tasa de multiplicación, de 1 a 8 plántulas por año (Hernández, 2004), por lo cual, se requiere disponer de numerosas plantas madres. Por lo expuesto, la propagación convencional no permite una multiplicación masiva por el tiempo y el costo.

La propagación clonal *in vitro* llega como una alternativa para cubrir las demandas a nivel mundial, considerado como un método rápido y fiable, del cual se obtienen grandes cantidades de plantas, a partir de tejidos, órganos provenientes de una planta madre (Prieto, *et al.*, 2005). Las ventajas de la propagación *in vitro* son: altas tasas de multiplicación en un menor tiempo, espacios reducidos, producción de plantas libres de plagas y enfermedades (Mroginski y Roca, 1991; López *et al.*, 2013). Por lo general para la propagación clonal de anturios se usa la organogénesis a través de explantes foliares (Cardoso y Habermann, 2014).

Diversos estudios demuestran que el cultivo *in vitro* permite conseguir una multiplicación masiva de *A. andreaum*, así, Montes, Morales y Bell (2004) reportaron 10 brotes adventicios por explante en 3,8 meses usando como material de partida segmentos de hojas, de igual manera, Winarto, Rajmawati y Teixeira (2011) consiguieron 9 brotes por explante en dos meses. A su vez, Prakasha, Ramya y Srinivasalu (2017) obtuvieron de 30 a 60 brotes/explante

en dos meses. La presente investigación tuvo como objetivo general evaluar el efecto de cuatro combinaciones hormonales, dos concentraciones de medio de cultivo en la micropropagación *in vitro* de tres cultivares de *Anthurium andreanum*, con la finalidad de obtener una alta tasa de generación de brotes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de cuatro combinaciones hormonales, dos concentraciones de medio de cultivo en la micropropagación *in vitro* de tres cultivares de *Anthurium andreanum*.

2.2 Objetivos específicos

- Establecer un protocolo de desinfección de los explantes de hoja para los tres cultivares de *Anthurium andreanum*.
- Evaluar el nivel hormonal para la inducción de brotes a partir de calogénesis en los tres cultivares de *Anthurium andreanum*.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Género *Anthurium*

El género *Anthurium* es autóctono de los Andes de América Central y Sudamérica, que tiene alrededor de 1500 especies tropicales (Farsi *et al.*, 2012), el horticultor y paisajista francés Édouard François André descubrió el *Anthurium andreanum* Linden ex André en una expedición realizada en el año de 1876 en el sur de Colombia y norte de Ecuador (Puccio, 2008). La especie *Anthurium andreanum* se clasifica según se muestra en la tabla 1:

Tabla 1

Taxonomía de la especie A. andreanum.

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Liliopsida</i>
Familia	<i>Araceae</i>
Genero	<i>Anthurium</i>
Especie	<i>Anthurium andreanum</i>

Fuente: Salgado (2007).

3.2 Cultivares de *Anthurium andreanum*

Salgado (2007) menciona que existen los siguientes cultivares de *A. andreanum*:

Acrópolis, Alii, Avanti Casino, Avoanneke, Avoclaudia, Avonette, Bettina, Blush Bride, Blush Oishi, Champion, Cuba, Fantasia, Kalapana, Kozohara, Lavander Lady, Linden ex André, Limbo, Lunette, Merengue, Marian Seefurth, Mickey Mouse, New Pahoia Red, Nitta, Oshiro Red, Oshiro White, Ozaki, Paradise, Plew Thien Phuket, Rainbow, Red Obake, Sarah, Schott, Scorpion, Sonata, Tatsata Pink, Tropical Mist, Tropical, Uranus, Valantino. (p. 8)

3.3 Descripción botánica

Posee raíces robustas en forma de cilindro, hojas de tipo cordiforme con tallo caulinar y sencillo de manera que cuando envejece pasa de herbáceo a semileñoso. La espata es conocida como la flor del Anturio que básicamente es una hoja modificada (Folgosó *et al.*, 2007) con presencia de un espádice que se exhibe de diversos colores según la especie o híbrido, los colores más frecuentes son verde, blanco y amarillo o son iguales a sus espatas, el fruto es una baya que contiene entre una y dos semillas (Salgado, 2007). En la figura 1 se presenta un esquema de las partes y desarrollo de *Anthurium andreanum*.

Figura 1 Partes y desarrollo vegetativo de *A. andreaeanum*



Fuente: Anthura, (2024)

3.4 Hábitat en que se desarrolla el Anthurium

La temperatura óptima para este cultivo es similar a la de un bosque tropical desde los 26 a 30°C y una humedad relativa desde 79 a 90% (Hernández, 2004), es una especie de sotobosque ya que la luz directa del sol ocasiona quemaduras en hojas y flores. Esta planta requiere de suelo con buena aireación y drenaje donde el pH óptimo es de 5,7 (Folgozo *et al.*, 2007; Hernández, 2004).

3.5 Plagas y enfermedades

Las principales plagas que atacan al Anturio son: Trips, Mosca blanca y Ácaros. Las enfermedades fúngicas más comunes son ocasionadas por los géneros: *Phytophthora*, *Colletotrichum* y *Septoria* (Bonilla, 1974; Folgozo *et al.*, 2007); y las enfermedades bacterianas son ocasionadas por: *Xanthomonas campestris pv. dieffenbachiae*, *Erwinia carotovora*; las mismas que ocasionan diversos tipos de alteraciones al tejido vegetal (Folgozo *et al.*, 2007).

3.6 Métodos de propagación

3.6.1 Propagación sexual

Es un método muy poco utilizado a nivel industrial por ser lento y poco beneficioso (Montes, Morales, & Bell, 2004), la baja cantidad de semillas, la conservación inadecuada y la rápida

pérdida de viabilidad dificulta el proceso germinativo de las mismas (Morales *et al.*, 2014), además, existe alta variabilidad genética (desarrollo y tiempo inicial de inflorescencia) en plantas obtenidas a partir de semillas (Hernández, 2004; Jahan *et al.*, 2009).

3.6.2 Propagación asexual

Este método de propagación que se realiza por medio de brotes, tallos, división de plantas y acodos aéreos, esta forma de multiplicación requiere de extensos periodos de tiempo y un gran número de plantas madres para la obtención de material de siembra (Hernández, 2004; Cardoso & Habermann, 2014). Además, se cataloga como la principal fuente de dispersión de plagas y enfermedades, esto debido a que los agentes fitopatógenos aprovechan las heridas que se ocasiona al extraer los propágulos para iniciar el proceso infectivo.

3.6.3 Propagación *in vitro*

Llamada también cultivo *in vitro* es un proceso de multiplicación asexual que consiste en tomar una porción del tejido u órgano vegetal, como hojas, tallos, raíces, etc, de una planta madre. Estos explantes se depositan en un medio de cultivo nutritivo estéril adicionado con sacarosa, vitaminas, antioxidantes y biorreguladores de crecimiento, y almacenado en condiciones ambientales controladas y asépticas (Mireles *et al.*, 2015). El cultivo *in vitro* requiere de cinco etapas bien definidas, las cuales son:

0. Selección de la planta madre
1. Establecimiento del cultivo
2. Multiplicación
3. Enraizamiento
4. Aclimatación

3.6.3.1 Fase 0: Selección de la planta madre

Es un paso de suma importancia, en la cual se eligen plantas madres con características agronómicas de interés. Trasladarlas a un invernadero con condiciones ambientales controladas, y además garantizar que las plantas madres estén libres de plagas y enfermedades para garantizar el éxito del cultivo *in vitro* (Suárez, 2020)

3.6.3.2 Fase 1: Establecimiento del cultivo

En esta fase el tejido vegetal debe pasar por un proceso de desinfección para controlar asepsia del cultivo *in vitro*. Los agentes desinfectantes más usados en la micropropagación son Etanol al 70%, Hipoclorito de sodio en diferentes concentraciones que van de 0,2 al 2% y Cloruro de Mercurio de 0.01 al 0.05% (Levitus *et al.* 2010).

3.6.3.3 Fase 2: Multiplicación

Esta fase implica dos pasos, el primero tiene que ver con la supervivencia y desarrollo del explante, se utiliza un medio de cultivo con bajas concentraciones de biorreguladores, para garantizar una adecuada adaptación del explante. En el segundo paso, se induce la formación de brotes, para ello, se usa un medio de cultivo con mayor concentración de citoquininas y menor nivel de auxinas (Suárez, 2020), con la finalidad de aumentar la tasa de multiplicación de brotes, subcultivando periódicamente mediante divisiones y resiembras, usando un medio de cultivo de multiplicación (Indacochea y Parrales, 2017).

3.6.3.4 Fase 3: Enraizamiento

Esta fase consiste en inducir raíces en los nuevos individuos, los brotes conseguidos en la fase de multiplicación son llevados a un medio suplementado con altas concentraciones de auxina o sin biorreguladores, según el requerimiento de la especie (Indacochea y Parrales, 2017). Esta parte es muy importante en el cultivo *in vitro* ya que de esta dependerá el porcentaje de sobrevivencia en la aclimatización y campo (Fernández *et al.*, 2015).

3.6.3.5 Fase 4: Aclimatización

Las plántulas obtenidas a nivel *in vitro* presentan anomalías morfológicas y fisiológicas, mismas que deberán corregir cuando sean llevadas a un medio externo. Este periodo de acondicionamiento es llamado fase de aclimatización, siendo necesario un control preciso de las condiciones ambientales tales como: humedad relativa, temperatura e intensidad lumínica, para reducir la deshidratación, estimular la regulación estomática y la fotosíntesis, y así obtener un rápido crecimiento y desarrollo de la plántula (Castillo y Abdelnour, 2010); (Mroginski y Roca, 2010). En esta fase se debe trabajar con sustratos de características físicas óptimas.

3.7 Explante

Se considera como explante a un pequeño fragmento proveniente del tejido u órgano vegetal extraído de una planta madre, las partes más usadas para el cultivo *in vitro* son ápices, meristemas caulinares, hojas, entrenudos, cotiledones, raíces, anteras. Todos los explantes, sufren desdiferenciación y diferenciación de tejidos conocido como respuesta morfogénica provocando la formación de una nueva planta (Mroginski y Roca, 1991). Este fenómeno se da gracias a las células totipotentes, definida como la capacidad que tiene cualquier célula vegetal para dar origen a nuevos tejidos, hasta obtener una planta completa genéticamente idéntica a su progenitor (Torres *et al.*, 2021).

3.8 Protocolo de desinfección

Según Pierik (1997), hay cuatro fuentes de contaminación: la especie tratada, el medio de cultivo, el ambiente y el operante. El factor más importante es el material vegetal, donde los explantes deben esterilizarse antes de ser colocados en el medio de cultivo. Todo material a usar en el cultivo *in vitro*, de igual manera debe desinfectarse con el fin de evitar contaminación endógena y exógena de los explantes.

Los principales microorganismos que se presentan en el cultivo *in vitro* principalmente son: bacterias, hongos y levaduras. Los géneros de bacterias que se encuentran son: *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Lactobacillus* *Pseudomonas*, *Staphylococcus* y *Xantomona* y los hongos más frecuentes son: *Aspergillus*, *Candida*, *Cladosporium*, *Penicillium* y *Scacharomyces* (Sharry *et al.*, 2015).

Los agentes desinfectantes frecuentemente usados en el cultivo de tejidos vegetales son: Etanol al 70%, esta solución no elimina todos los microorganismos contaminantes, por ello, se usa Hipoclorito de Sodio (NaClO) en diversas concentraciones. Pierik (1997) realizó un tratamiento de esterilización en el cultivo *in vitro* de *A. andreanum* a partir de hojas desinfectando con NaClO al 1% por 30 minutos. En la Tabla 2 se muestran algunas soluciones desinfectantes y protocolos usados en diferentes explantes provenientes de diferentes tejidos u órganos de *A. andreanum*.

3.9 Condiciones ambientales

Hay que tener en cuenta ciertos parámetros para la incubación de los cultivos *in vitro*, como: temperatura, cantidad y calidad de la luz y fotoperiodo. Diversos estudios realizados en *A. andreanum* usaron condiciones ambientales relativamente iguales, en cuanto a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, una densidad lumínica de 13 a 23 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ y un fotoperiodo de 12 h luz/12 h oscuridad (Huang *et al.*, 2019; Ya-Ling *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021).

3.10 Medio de cultivo y sus componentes

Es una solución que contiene sales inorgánicas y compuestos orgánicos necesarios para la nutrición y la regeneración de la especie cultivada *in vitro*. El medio de cultivo por lo general está conformado por macronutrientes, micronutrientes, vitaminas y aminoácidos (; Pizarro, 2012; Sharry, *et al.*, 2015; Levitus, *et al.*, 2021).

3.10.1 Macronutrientes y micronutrientes

Se los denomina también nutrientes minerales, los mismos que requieren de una forma continua. Los más importantes macronutrientes son: el nitrógeno y potasio destacan por su mayor concentración en el medio de cultivo (Levitus, *et al.* 2010), el magnesio, azufre y fósforo

en menor dosificación. Los micronutrientes son requeridos en pequeñas cantidades como: boro, manganeso, hierro, zinc, cobre, molibdeno y cobalto (Saran y Kumar, 2013) necesarios para la síntesis de clorofila y la función de cloroplastos.

Tabla 2

Soluciones desinfectantes usadas por diferentes autores en la micropropagación de A. andreanum con el uso de diversos explantes

Partes	Soluciones desinfectantes	Autor
Hojas, pecíolos, espata, espádice y raíces	NaClO al 1% (adicionando dos gotas de Tween 20) por 30 min, lavado por 3 veces en periodos de 30 min en agua destilada estéril (ADE).	Finnie y Staden, 1986
Yemas apicales	Detergente Teopol, solución antifúngica Cetrimide por 5 min, NaClO por 5 minutos, Cloruro Mercúrico por 5 min y lavado con ADE por 4 a 5 veces.	Gantait, Mandal, Bhattacharyya, y Das, 2008
Espádices	NaClO al 1% por 10 min, NaClO al 2% por 5 min, etanol al 80% por 30 s y lavado 5 veces con ADE.	Winarto y Texeira, 2012
Semillas	Cloro comercial al 20% por 20 min, 3 lavados con ADE.	Mireles <i>et al.</i> , 2015

3.10.2 Vitaminas

Las plantas completas compensan ellas mismas sus vitaminas, al existir una ausencia dentro de las plantas que son cultivadas *in vitro*, se adiciona conforme a las necesidades de la especie a cultivar para un correcto crecimiento y desarrollo del material vegetal. Las vitaminas que se usan mayoritariamente en los cultivos *in vitro* son: Tiamina, Niacina, piridoxina-HCl, Vitamina H, Folacina, Vitamina B5 y Vitamina B2. (Sharry *et al.*, 2015)

3.10.3 Azúcares

Las especies cultivadas *in vitro* entran en una fase heterotrófica por lo que necesitan carbohidratos para cumplir sus diversas actividades metabólicas, la sucrosa es la principal fuente de carbono y se usa en concentraciones que va del 2 al 5% dependiendo de la planta a cultivar (Mroginski y Roca, 1991; Levitus *et al.* 2010; Suárez, 2020).

3.10.4 Agentes gelificantes

Dan consistencia y estabilidad al explante, los agentes gelificantes más usados son agar-agar y Phytigel, los cuales se disuelven en agua a punto de ebullición y solidifican alrededor de los 45° C (Prieto *et al.* 2005).

3.10.5 Agua

El agua constituye el 95% del medio de cultivo, sirve como disolvente para los solutos que son incorporados al medio nutritivo (Suárez, 2020), siendo obligatorio el uso de agua destilada y estéril, la cual está libre de electrolitos, compuestos inorgánicos, microbios y otros elementos contaminantes (Fundacion Aquae, 2020).

3.11 El pH

El pH genérico con el que se trabaja en el cultivo *in vitro* de especies vegetales es de 5.8 ± 0.2, ajustado con disoluciones de Ácido Clorhídrico (HCl) e Hidróxido de Sodio (NaOH) antes de colocar el gelificante (Te-chato *et al.*, 2006; Ramírez *et al.*, 2019; Huang, Yuan, & Chen, 2019), este nivel de pH permite la correcta absorción de nutrientes y biorreguladores, así como la correcta solidificación del medio de cultivo (Sharry *et al.*, 2015).

3.12 Reguladores de crecimiento (RC)

Son sustancias orgánicas naturales (hormonas) o sintéticas (biorreguladores), que regulan el crecimiento y desarrollo de las plantas, son efectivos a muy bajas concentraciones. El material vegetal *in vitro* no tiene la capacidad para producir estas hormonas para el desarrollo de sus procesos metabólicos, por lo cual es necesario la adición de los compuestos sintéticos (Suárez, 2020). Los RC se dividen en auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico, el etileno, entre otros.

3.12.1 Auxinas

Grupo de fitohormonas que se encargan de controlar el crecimiento y desarrollo de las plantas, las auxinas tienen la capacidad de incitar un agrandamiento y alargamiento, aunque existen reportes donde indican que favorecen la división celular en el cultivo *in vitro* (Mroginski y Roca, 1991). Las auxinas sintéticas ampliamente utilizadas son: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2-4D), Ácido naftalenacético (ANA), Ácido indolbutírico (IBA) (Mroginski y Roca, 1991; Cruz Pizarro, 2012).

El biorregulador 2-4D es una auxina ampliamente usada para inducir la desdiferenciación de tejidos y formación de embriones somáticos (Rivero, *et al.* 2008). En cambio, las auxinas sintéticas ANA e IBA son utilizadas para inducir dominancia apical, la diferenciación vascular

y el desarrollo de raíces, ANA se suele usar en dosis de 1 a 10mg/ L⁻¹ (Perea *et al.*, 2009; Mroginski y Roca, 1991).

El Ácido indolacético (AIA) es la hormona más importante de origen vegetal (Vega, *et al.* 2016), se sintetiza partiendo del aminoácido triptófano en el ápice de tallos, semillas en germinación y en células meristemáticas (Mroginski y Roca, 1991), esta hormona impulsa la elongación de brotes y raíces a través de un acelerado estímulo de los elementos de la pared celular (Jiménez *et al.*, 2019).

3.12.2 Citoquininas

Este grupo de hormonas impulsan la división celular, incitan la proliferación de brotes adventicios y yemas laterales e impiden la formación de raíces (Perea *et al.*, 2009). Las más usadas en el cultivo *in vitro* son: Kinetina (KIN), 6 Bencilaminopurina (BAP), Zeatina (ZEA) y Thidiazuron (TDZ) (Mroginski y Roca, 1991; Perea *et al.* 2009).

BAP es una de las más empleadas en el cultivo *in vitro*, por su capacidad en la inducción de yemas axilares (Mesa *et al.*, 2002); Kinetina, incita la generación de brotes adventicios, inhibe la generación de raíces y retrasa el envejecimiento, pero requiere de un correcto balance hormonal en el medio dosificada de 1 a 10 mg/L (Castañeda *et al.* 2009).

La TDZ, está valorada como una potente hormona en comparación a las otras, ya que en bajas dosificaciones inducen la proliferación de brotes axilares y en altas dosificaciones impulsa la generación de callo y embriones somáticos (Sajid y Aftab, 2009)

3.12.3 Giberelinas

Son terpenos que se sintetizan en todos los tejidos de los diferentes órganos, promueven la división y elongación celular (Perea *et al.*, 2009). Existen alrededor de 90 compuestos parecidos, pero el Ácido Giberélico (GA₃) es el más usado en el cultivo *in vitro*, ya que impulsa la prolongación de tallos conseguidos propagados *in vitro* y evolución de embriones somáticos en especies (Suárez, 2020).

3.13 Antioxidantes

Los antioxidantes son compuestos naturales o sintéticos que se encargan de estabilizar o reducir la oxidación (Perea *et al.*, 2009), es muy común el pardeamiento en material procedente de plantas leñosas, esto debido a que sintetizan grandes cantidades de lignina y los compuestos fenólicos son la base de ellos, lo que provoca una muerte celular y necrosis de los explantes (Mroginski & Roca, 1991; Prieto, *et al.* 2005).

Los productos que usan con mayor frecuencia son polivinilpirrolidona (PVP) en pesos moleculares de 360 o 6755, L-Cisteína, ácido ascórbico y carbón activado.

3.14 Medios de cultivo usados en la micropropagación *in vitro*

3.14.1 Medio de cultivo Murashige y Skoog (MS)

El medio MS, es el más usado en todo el mundo para la micropropagación de plantas y tejidos vegetales *in vitro* por su alto contenido en sales (Suárez, 2020). En el anexo A (tabla A1), se detalla los componentes del MS con vitaminas de Gamborg B5 el mismo que contiene micronutrientes, macronutrientes (1962) y vitaminas B5 (1968) descritas por Gamborg (PhytoTech Labs, 2014).

3.14.2 Medio de cultivo Nitsch y Nitsch (NN)

Este medio de cultivo se volvió popular para el cultivo haploide de ciertas especies de plantas (PhytoTech Labs, 2023), posee un bajo contenido de sales en comparación al medio de cultivo MS (EcuRed, 2023). En el anexo A, tabla A2, se detalla la formulación del medio.

3.15 Métodos de micropropagación de plantas

La propagación clonal se fundamenta en base a la especie a micropropagar, el explante usado, estado de la planta madre y el tipo de medio de cultivo usado (Perea, *et al.* 2009). En la figura 2 muestra algunos métodos de micropropagación como la organogénesis y embriogénesis tanto directa como indirecta.

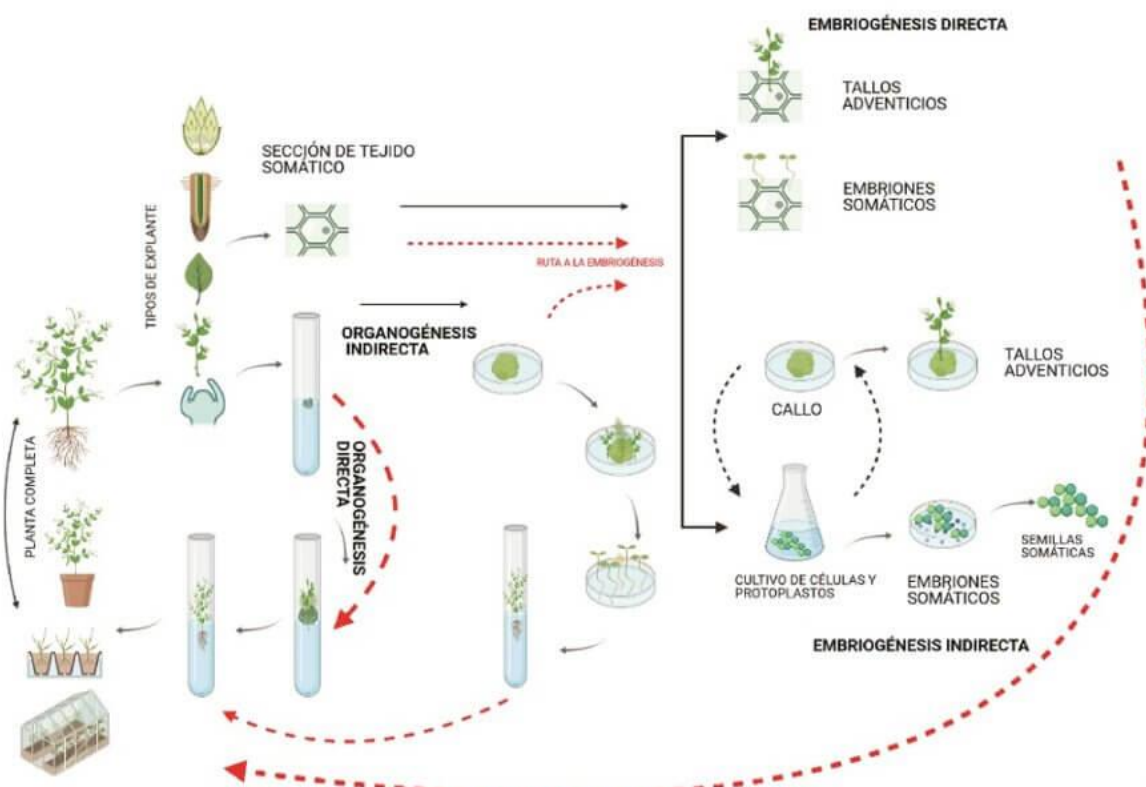
3.15.1 Cultivo de meristemos

Tejido de las plantas que poseen células jóvenes y totipotenciales capaces de multiplicarse continuamente; donde el tamaño del meristemo aislado debe tener una dimensión de 0.05mm-0.2mm de diámetro. Estos tejidos carecen de vías vasculares al estar ubicados en el ápice del tallo, por ende, carecen de presencia de fitopatógenos, lo que permite lograr la obtención de plántulas libres de virus (Perea *et al.* 2009; Solis *et al.*, 2011).

Este tipo de tejidos se clasifican en: meristemos primarios y secundarios, el primero se ubica en los ápices de brotes y raíces, y son los que generan desarrollo del largo de la planta. Dentro de este grupo se encuentran los caulinares, ubicadas en el polo apical, los meristemos radicales, se encuentran en el polo basal del embrión y darán lugar a la raíz y los intercalares que se encuentran en la base de los entrenudos (Perea *et al.*, 2009).

Los meristemos secundarios: encargados del crecimiento en volumen del tallo, se divide en el cámbium vascular que es el desarrollo del espesor de los tejidos vasculares y cambium suberoso que agranda la corteza originando el peridermis (Perea *et al.*, 2009).

Figura 2 Diversos procesos de micropropagación in vitro de plantas



Nota. En la gráfica se visualiza procesos morfogénicos como la organogénesis y embriogénesis tanto directa como indirecta. Fuente: Alchimia (2021).

3.15.2 Organogénesis

Es un método eficiente para la encapsulación, crioconservación, micropropagación y multiplicación masiva de especies, que se obtiene de segmentos provenientes de cualquier órgano de la planta (Bustamante *et al.*, 2022).

3.15.2.1 Organogénesis directa

Basado en la formación de órganos a partir de un explante donde los brotes se producen a partir de meristemos caulinares, sin la presencia intermedia de células desdiferenciadas (callo). Los explantes que responden adecuadamente a esta técnica deben poseer un alto nivel de juvenilidad y bajo grado de diferenciación. Los explantes al introducirse en el medio de cultivo nutritivo enriquecido con citoquininas, responden con la formación de meristemoides de los cuales se desarrollan los nuevos brotes adventicios (Mroginski y Roca, 1991, Suárez, 2020).

3.15.2.2 Organogénesis indirecta

Se da a partir de la formación del callo en el explante, la micropropagación por esta vía presenta variabilidad genética, definida como la presencia o ausencia de características deseables o no de la planta micropropagada (Perea *et al.* 2009; Rodríguez *et al.* 2014). Para promover el crecimiento de callo en los explantes, es imprescindible la adición de una combinación hormonal de citoquininas y auxinas en el medio de cultivo (Mroginski y Roca, 1991).

3.15.3 Embriogénesis somática

Consiste en la formación de un embrión somático a partir de una célula somática, puede ocurrir en una ambiente *in situ* e *in vitro*, ocurriendo las mismas fases de una reproducción sexual (Prieto *et al.* 2005). Hay dos tipos de embriogénesis: la directa, los embriones se manifiestan en el explante, y la indirecta que se originan a partir de una interrupción de células embriogénicas o de un callo (Sharry *et al.*, 2015).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Localización del ensayo

La investigación se realizó en el Centro de Investigación, Innovación y Transferencia de Tecnología (CIITT) perteneciente a la Universidad Católica de Cuenca en el laboratorio de Ecología Microbiana y Principios Activos.

4.2 Materiales

4.2.1 Material biológico

Las plantas madres de *A. andreanum* usadas fueron diez por cultivar, las mismas que fueron colocados bajo cubierta para su cuidado antes de la introducción al cultivo *in vitro*.

El material biológico fue tratado con un pesticida sistémico Kasumin (Kasugamicina)+ Dovex (Propamocarb hydrochloride) 15 días antes de la introducción *in vitro*, con la finalidad de eliminar microorganismos endófitos que dificulten su introducción, en la figura 3 se muestra el estado fitosanitario de los tres cultivares de *A. andreanum*.

4.2.2 Utensilios

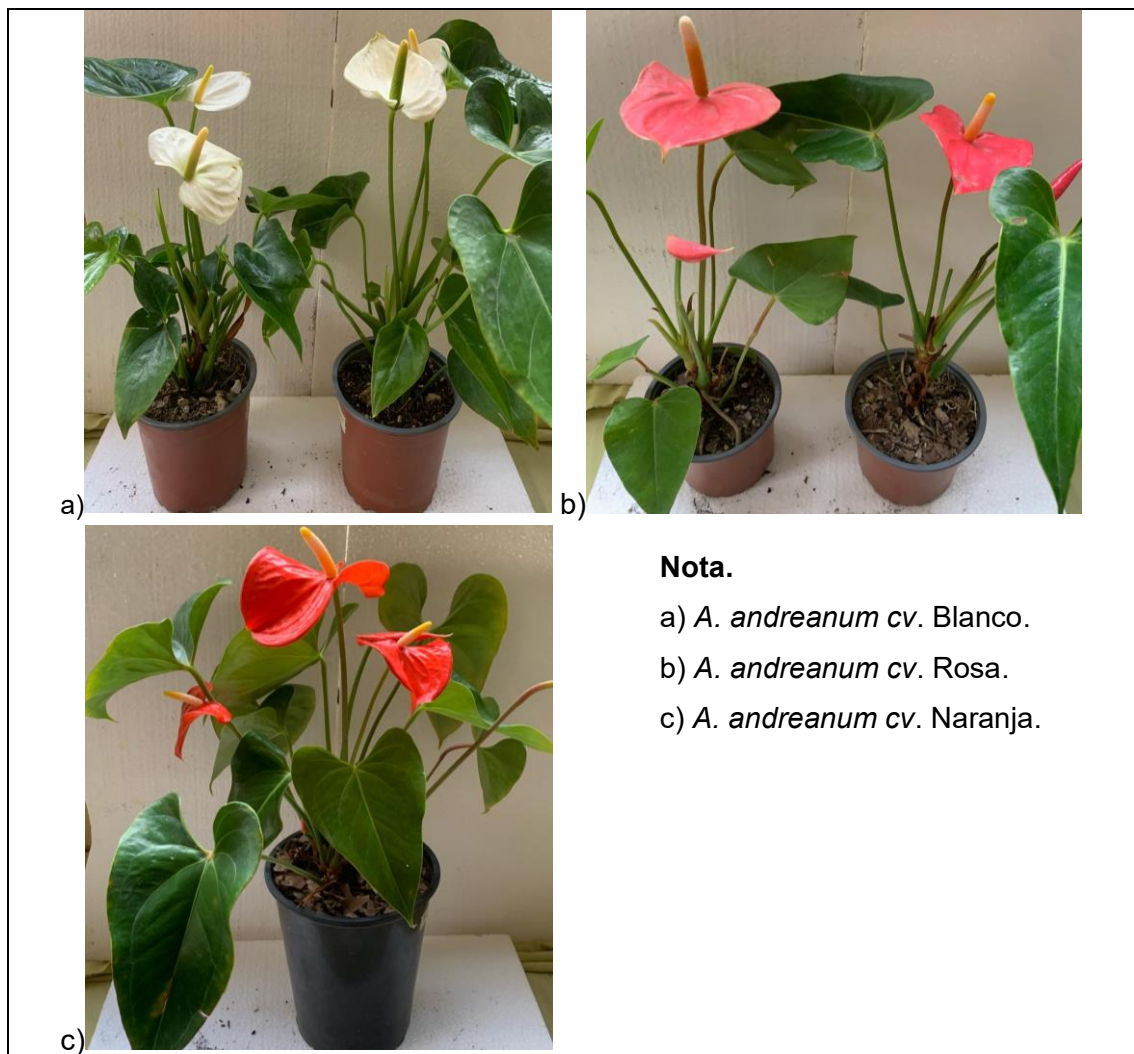
En la Tabla 3 se detallan los utensilios usados en la desinfección y siembra de los explantes foliares de *A. andreanum* cv. Blanco, Rosa y Naranja.

Tabla 3

Utensilios usados en el trabajo

Material	Cantidad
Envases de vidrio	150 u
Vasos de precipitado	6 u
Mascarillas	10 u
Guantes de caucho	20 u
Papel Kraft	1 paquete
Vidrio rectangular de 50*30 cm	1 u
Pinzas	2 u
Bisturíes	2 u

Figura 3 Cultivares de *Anthurium andreaenum* usados para la micropropagación *in vitro*



4.2.3 Equipos

En la Tabla 4 se detalla los equipos usados en la micropropagación *in vitro* de *A. andreaenum* cv. Blanco, Rosa y Naranja.

Tabla 4

Equipos usados para la micropropagación de los tres cultivares de A. andreaenum

Equipo
Cabina de flujo laminar
Autoclave
Agitador magnético
Micropipetas
pHmetro
Balanza analítica

4.2.4 Reactivos

En la Tabla 5 se expone los reactivos manipulados en la micropropagación *in vitro* de los tres cultivares de *A. andreanum*.

Tabla 5

Lista de reactivos usados en la micropropagación in vitro de tres cultivares de A. andreanum (Blanco, Rosa y Naranja).

Reactivos	Concentración	Casa comercial
Medio basal Murashige and Skoog (MS) con vitaminas de Gamborg B5	50 y 100%	PhytoTech Labs
N-6 Bencilaminopurina (BAP)	95%	Sigma-Aldrich
Kinetina (KIN)	95%	Sigma-Aldrich
Thidiazuron (TDZ)	95%	Sigma-Aldrich
Ácido Indolbutírico (IBA)	95%	Sigma-Aldrich
Ácido Naftalenacético (ANA)	95%	Sigma-Aldrich
2,4 clorofenoxiacético (2-4D)	95%	Sigma-Aldrich
Agua + jabón	1 % v/v	
Tween 20	1 % v/v	Sigma-Aldrich
Etanol	70 % v/v	
NaClO	5 % v/v	Cloro comercial

4.3 Métodos

El proceso experimental cuenta con dos objetivos específicos. El primero, establecer un protocolo de desinfección para los tres cultivares de *A. andreanum*. Para ello, se probaron dos variables independientes (protocolos de desinfección y tres cultivares) y dependientes (porcentaje de contaminación y porcentaje de pardeamiento). Para la fase experimental, se utilizó un diseño factorial 2x3, con un esquema de aleatorización completamente al azar con 3 repeticiones. La unidad experimental consistió en 5 frascos con 20 ml de medio de cultivo y 2 explantes.

El segundo, evaluar el nivel hormonal para la inducción de brotes a partir de callogénesis en los 3 cultivares de *Anthurium andreanum*. Para dar cumplimiento a este objetivo se probaron dos variables independientes (combinación hormonal y 3 cultivares) y dos dependientes (formación de callo y número de brotes). Se trabajó con un diseño factorial 5x3 con un esquema de aleatorización completamente al azar con 3 repeticiones. La unidad experimental consistió en 3 frascos con 20 ml de medio de cultivo y 2 explantes.

4.4. Fase experimental para el objetivo 1

4.4.1. Fase de campo

Para la introducción *in vitro* de los tres cultivares de *A. andreanum* se recolectaron hojas jóvenes brillantes y sanas proveniente de plantas madres de 1 año de edad aproximadamente, mismas que tenían una longitud de 5 a 10 cm, de acuerdo a las recomendaciones de Pierik (1997), como se muestra en la figura 4. La recolección del material vegetal se realizó en horas de la mañana.

4.4.2 Fase de laboratorio

El material vegetal recolectado se trasladó al laboratorio de Ecología Microbiana y Principios Activos de la Universidad Católica de Cuenca, allí se procedió a cortar las hojas en fragmentos de 3 a 5 cm dependiendo del tamaño de la hoja, para facilitar la manipulación. Posteriormente, las fracciones de hoja fueron lavados con agua, jabón líquido y abundante agua corriente para eliminar cualquier tipo de impureza externa. A continuación, los pedazos de hojas se depositaron en un vaso de precipitado, adicionando 5 gotas de Tween 20 en 500 ml de agua de la llave y colocado en un agitador por 20 min, transcurrido ese periodo de tiempo se lavó con agua corriente de la llave y se llevó a cámara de flujo laminar, para desarrollar el tratamiento de desinfección uno, que trataba en sumergir los fragmentos de hojas en etanol al 70% por 30 segundos, lavado con agua destilada estéril (ADE) por 3 veces, inmersión en NaClO al 0.5% por 15 min y lavado con ADE por 3 veces.

En cambio, para el protocolo de desinfección dos, los fragmentos de hojas se sumergieron en etanol al 70% por 1 minuto, se lavó con ADE por 3 veces. Posteriormente, se sumergió en NaClO al 1% por 15 minutos, lavado con ADE por 3 veces y se introdujo por segunda vez en NaClO al 0.5% por 5 minutos y se lavó con ADE por 3 veces (ver figura 5).

4.4.3 Tratamientos evaluados en el primer objetivo

En la Tabla 6, se resume los tratamientos usados en la desinfección de hojas de *A. andreanum* cv. Blanco, Rosa y Naranja.

Tabla 6

Protocolos evaluados en la desinfección de los fragmentos de hoja proveniente de tres cultivares *A. andreaenum*

Tratamientos	Solución desinfectante	Tiempo de inmersión
Protocolo de desinfección 1	Etanol al 70%	30 s
	Hipoclorito de sodio al 0.5%	15 min
Protocolo de desinfección 2	Etanol 70%	1 min
	Hipoclorito de Sodio al 1%	15 min
	Hipoclorito de Sodio al 0.5%	5 min

Figura 4 Características del material vegetal utilizado en la micropropagación *in vitro* de los tres cultivares de *A. andreaenum*.



4.4.4 Variables a medir en el primer objetivo

4.4.4.1 Porcentaje de contaminación a los 5, 15 y 30 días después de la siembra (DDS)

Se determinó la presencia o ausencia de microorganismos sobre el medio y/o explante, a través de la observación, donde se contabilizaron los envases contaminados por cada ensayo como muestra la figura 6.

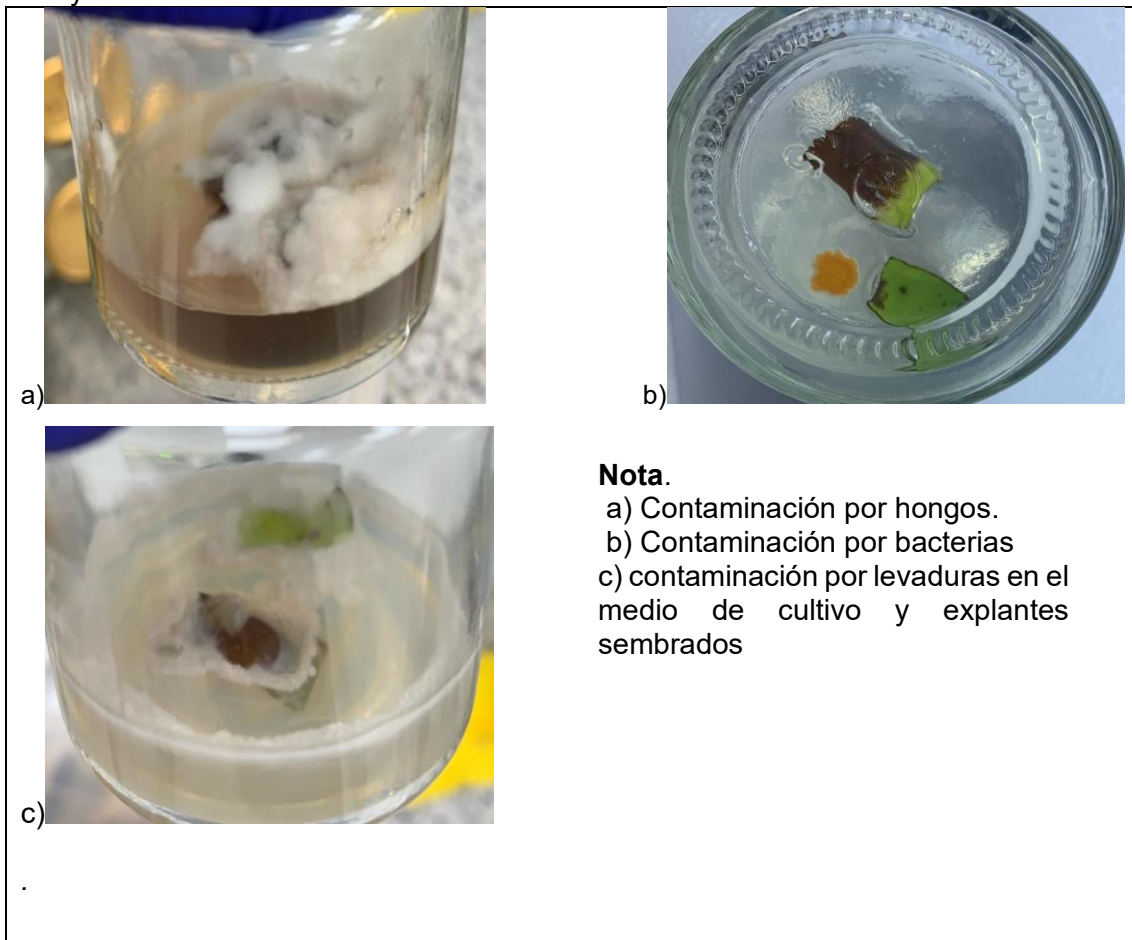
Figura 5 Desarrollo de los protocolos de desinfección de los explantes provenientes de hoja de *A. andreaenum*



4.4.4.2 Porcentaje de pardeamiento a los 5, 15 y 30 DDS

Se evaluaron los explantes que presentaron oxidación, los cuales se calificaron de acuerdo a la escala porcentual que se muestra en la figura 7.

Figura 6 Presencia de microorganismos contaminantes encontrados en los diferentes ensayos



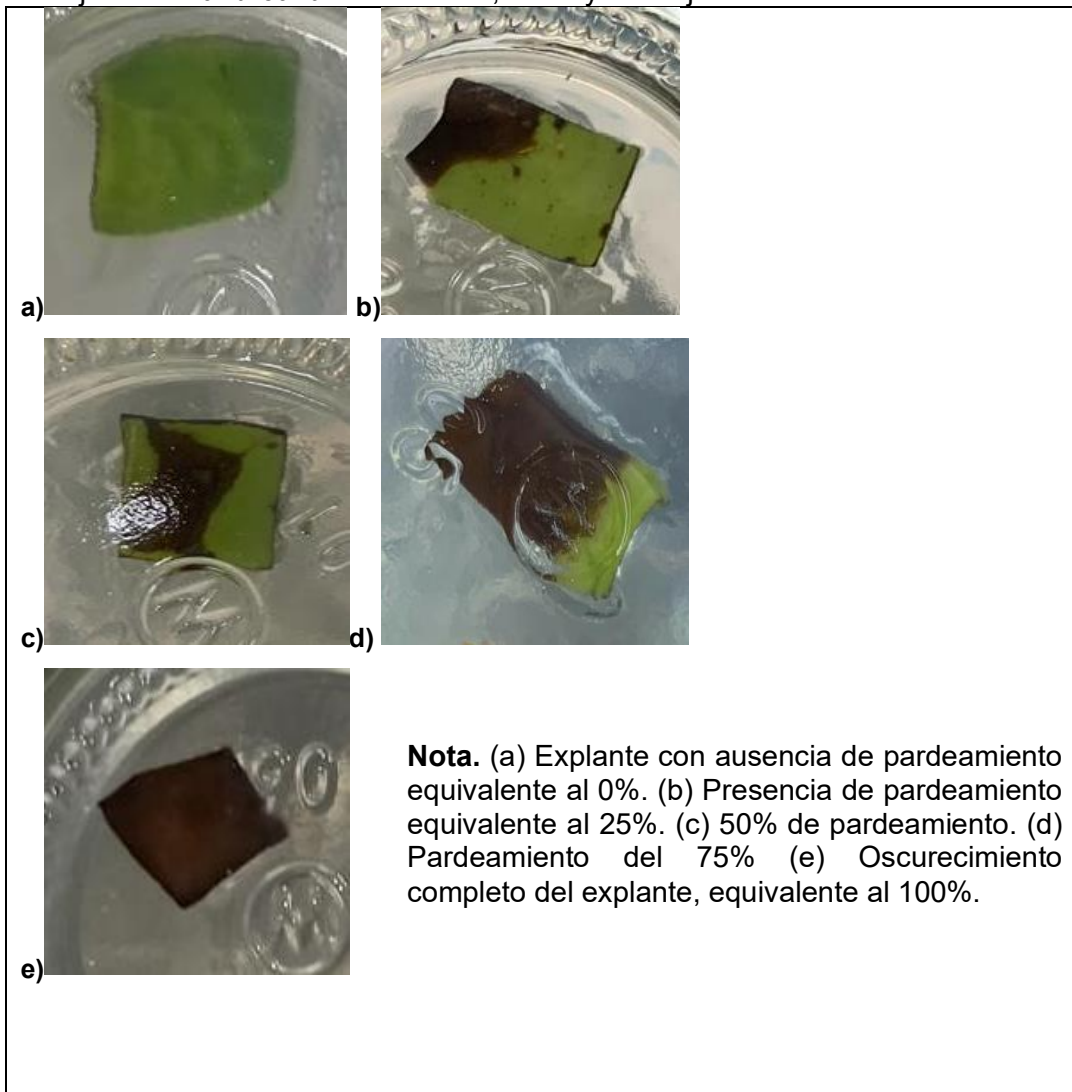
4.5. Fase experimental para el objetivo dos

Dentro de la cámara de flujo laminar se procedió a sacar explantes de hoja de los tres cultivares de *A. andreanum* de 1cm² y fueron colocados de manera horizontal en contacto con el medio de cultivo MS al 50 y 100%, suplementado con las combinaciones de biorreguladores evaluadas.

4.5.1 Medio de cultivo

Se utilizó el MS modificado con las vitaminas de Gamborg B5 al 50 y 100%, suplementado con PVP a 500 ppm, se ajustó el pH a 5,8± 0,2 y se esterilizó en autoclave a 121°C y 1.2 kg cm² de presión, durante 15 minutos.

Figura 7 Escala porcentual del nivel de pardeamiento u oxidación exhibida en los explantes de hojas de *A. andreaum* cv. Blanco, Rosa y Naranja.



4.5.2 Tratamientos

Se probaron cuatro combinaciones hormonales en la inducción de callo y formación de brotes (Ver tabla 7).

4.5.3 Variables a medir

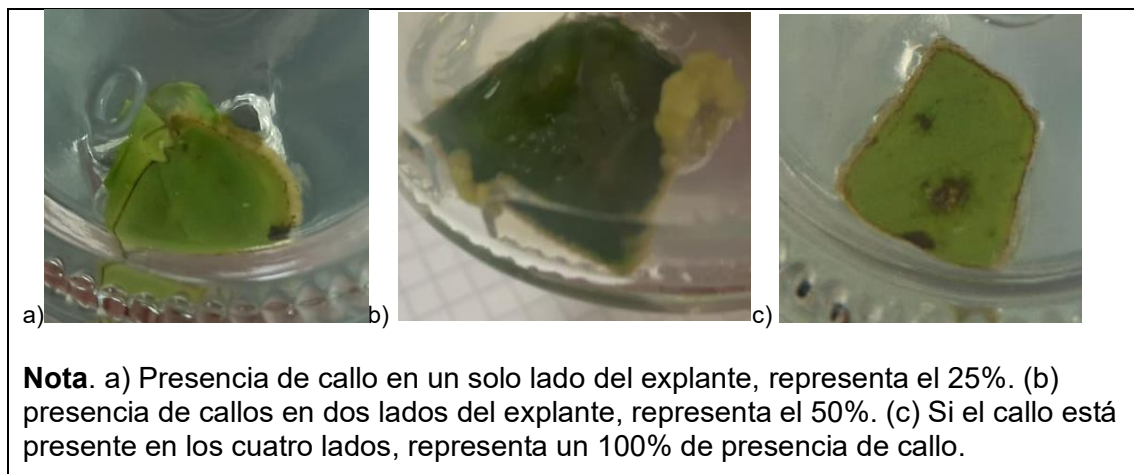
4.5.3.1 Formación de callo

Se evaluó la formación del callo alrededor del explante a los 75 DDS. Se estimó que cada lado del explante represente el 25% y si el callo está presente en los cuatro lados se consideró el 100%, como muestra la figura 8.

Tabla 7

Combinaciones hormonales usadas en el trabajo

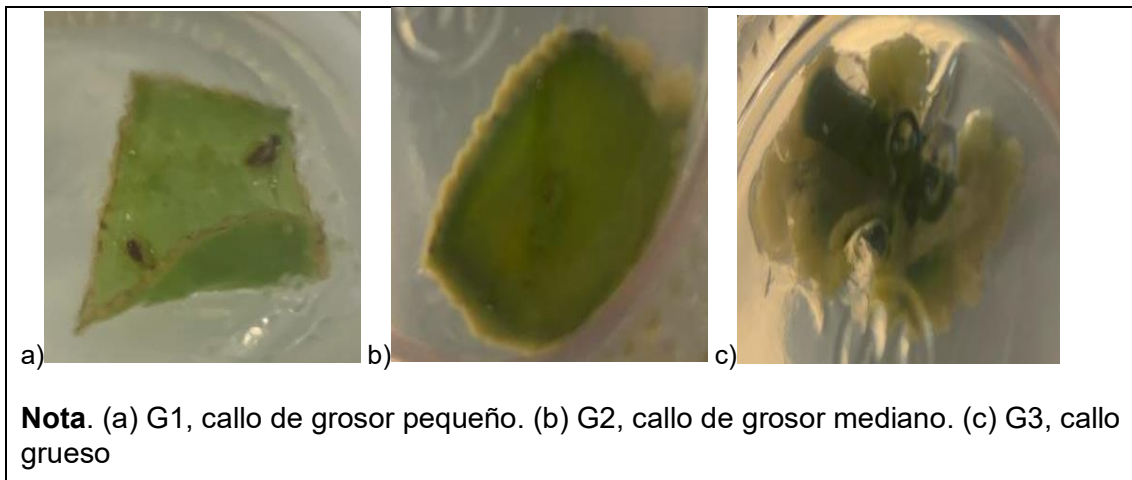
Tratamiento	Citoquinina + Auxina	Concentración (mg/l)
T1	BAP + IBA	5,0 + 0,5
T2	KIN + ANA	2,0 + 1,0
T3	TDZ + 2-4 D	0,5 + 0,2
T4	BAP + 2-4 D	0,5 + 0,2
T5 (testigo)	-----	-----

Figura 8 Escala de formación de callo alrededor del explante de hoja de *A. andreaenum*.

Grado del callo

Se evaluó además el grado de callo generado en los tres cultivares de *A. andreaenum* y en cada uno de los tratamientos a los 90 DDS, Se categorizó en tres escalas, grado uno (G1), dos (G2) y tres (G3). Como se describe en la figura 9.

Figura 9 Categorización del callo en los explantes



4.5.3.2 Formación de brotes

Se contó el número de brotes formados en los tres cultivares de Anturio y en cada tratamiento evaluado. Se consideró como brote a cada ramificación mayor a 5 mm.

4.5.4 Condiciones ambientales

Los explantes se sembraron en las concentraciones de medio de cultivos establecidas en los tratamientos establecidos y se colocaron en condiciones de obscuridad a 24 ± 2 °C durante 60 días. Transcurrido este periodo de tiempo se llevó a la luz con un fotoperiodo de 16 horas luz manteniendo la misma temperatura.

4.5.5 Análisis estadístico

Los datos de la presente investigación se analizaron con el software estadístico R, V. 4.1.4. Para los datos experimentales de los Objetivos específicos uno y dos se ajustó un modelo factorial. Los supuestos de normal y la homogeneidad de varianza se analizaron con las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. La comparación entre tratamientos se realizó con la prueba de la Diferencia Mínima Significativa (LSD) con corrección de Holm para corregir multiplicidad dentro de cada familia de comparaciones. Todas las pruebas se estimaron a un nivel de significación del 5%.

5. RESULTADOS

5.1 Porcentaje de Contaminación

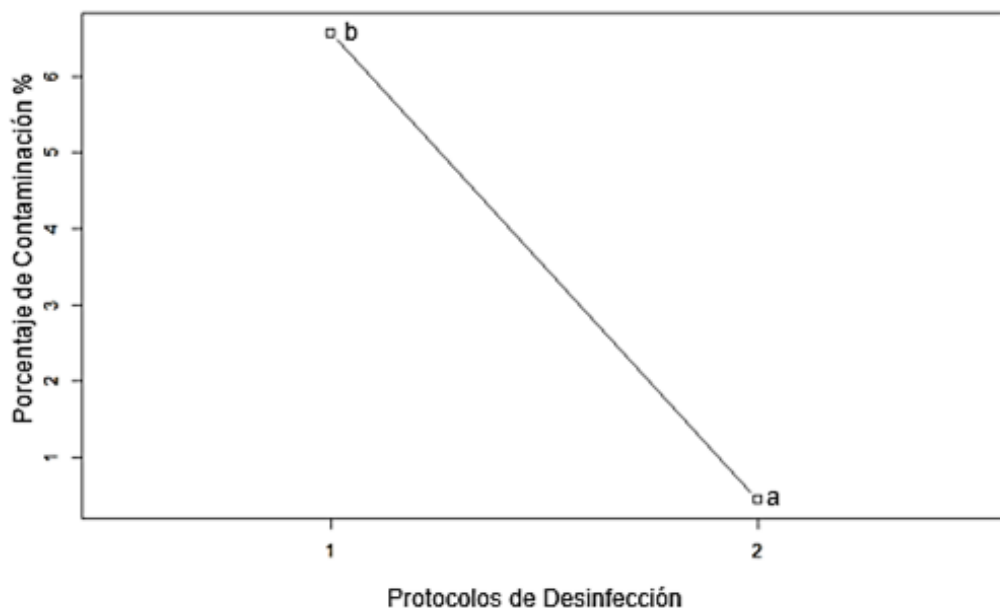
Los datos de la variable porcentaje de contaminación tomados a los 5, 15 y 30 DDS no presentaron desviaciones severas de los supuestos de normalidad (normalidad $p = 0.27$ y homogeneidad de varianza $p = 0.31$).

5.1.1 Porcentaje de contaminación a los 5 DDS

El ANOVA (Anexo B, tabla B1) presentó diferencia estadística significativa únicamente para el primer factor evaluado Protocolo de Desinfección ($p = 0.0046$) y no evidenció diferencia significativa para el segundo factor en estudio Cultivares de Anturio, así como para su interacción de primer orden entre Protocolos de Desinfección y Cultivares. Por lo tanto, se analizó el efecto principal del factor Protocolo de Desinfección.

El Protocolo de Desinfección dos difirió estadísticamente del uno al ser evaluado en los tres cultivares de Anturio, evidenciando el menor porcentaje de contaminación 0,44% en comparación con el uno que alcanzó un promedio mayor de 6, 57% (Figura 10).

Figura 10 Efecto principal de dos Protocolos de Desinfección sobre la variable de respuesta porcentaje de contaminación de explantes de hojas de tres cultivares de *A. andreaum*, a los 5 DDS usando medio de cultivo semisólido.

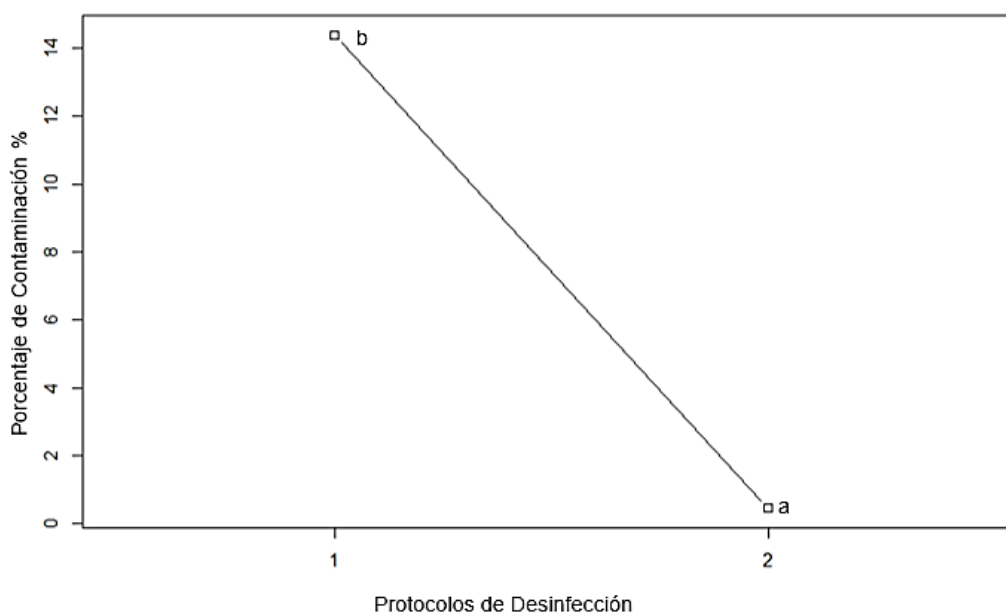


5.1.2 Porcentaje de contaminación a los 15 DDS

El ANOVA (Anexo B, tabla B2) realizado para el porcentaje de contaminación a los 15 DDS no evidenció diferencia significativa para la interacción de primer orden entre Protocolo de Desinfección y Cultivares de Anturio, así como para el efecto principal del factor Cultivares. Sin embargo, si mostró diferencia estadística significativa para el efecto principal del factor Protocolo de Desinfección ($p = 0.0026$), por lo tanto, se analizó el efecto promedio de este factor, en los tres cultivares en estudio.

El Protocolo de Desinfección dos mostró el menor porcentaje de contaminación 0,44% a los 15 DDS, difiriendo estadísticamente del protocolo uno quien evidenció una mayor contaminación del 14,4% (Figura 11).

Figura 11 Efecto principal de dos Protocolos de Desinfección sobre la variable de respuesta porcentaje de contaminación de explantes de hojas de tres cultivares de *A. andreanum*, evaluado a los 15 DDS usando medio de cultivo semisólido

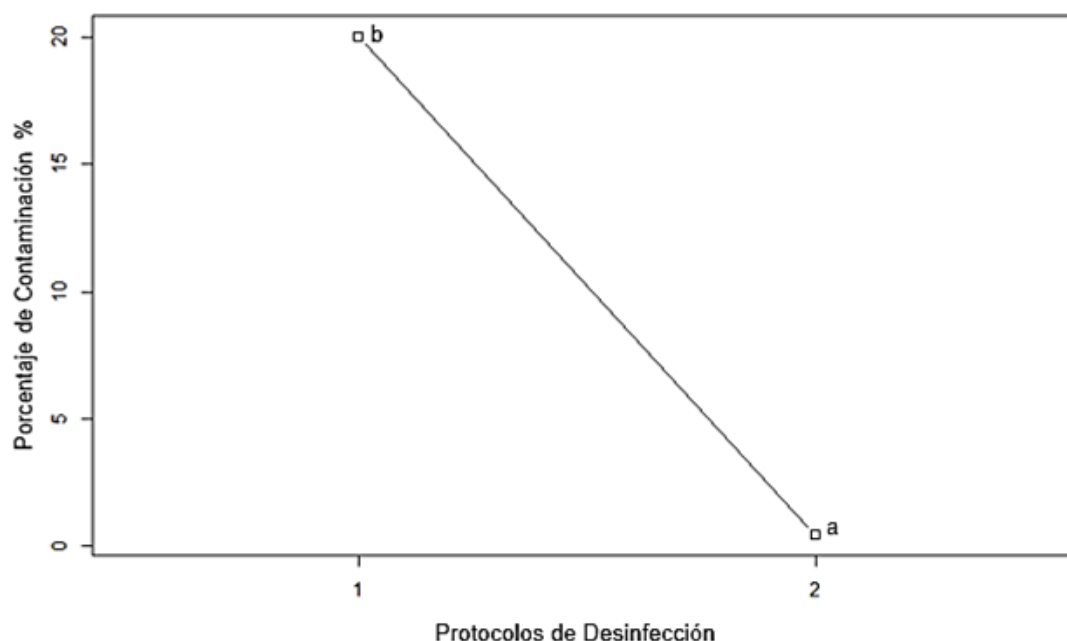


5.1.3 Porcentaje de contaminación a los 30 DDS

El ANOVA (Anexo B, tabla B3) realizado a los 30 DDS, no mostró diferencia significativa para la interacción de primer orden, entre los factores Protocolo de Desinfección y Cultivares de Anturio, así como para el efecto principal del segundo factor Cultivares. Evidenciando únicamente diferencia estadística significativa para el efecto principal del factor Protocolo de desinfección ($p = 0.0026$), por lo tanto, se analizó el efecto promedio de este factor en estudio.

El Protocolo de Desinfección dos evidenció el menor promedio de contaminación 0,44 % a los 30 DDS, en comparación con el Protocolo uno que alcanzó un 20,04% (Figura 12). Lo que indica que el Protocolo dos fue el mejor tratamiento para la eliminación de agentes contaminantes de los explantes de hojas de Anturio.

Figura 12 Efecto principal de dos Protocolos de Desinfección sobre la variable de respuesta porcentaje de contaminación de explantes de hojas de tres cultivares de *A. andreaum*, evaluado a los 30 DDS usando medio de cultivo semisólido.



5.2 Porcentaje de pardeamiento

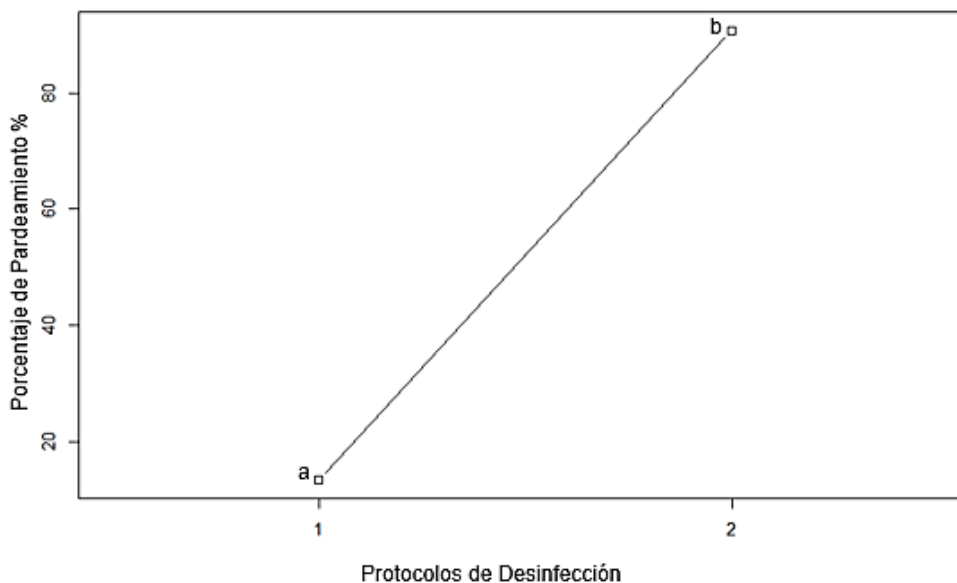
Los datos de la variable de respuesta porcentaje de pardeamiento de los explantes de las hojas de Anturio tomado a los 5, 15 y 30 DDS no presentaron desviaciones graves de los supuestos de normalidad (normalidad $p = 0.03$ a los 5 DDS; $p = 0.6$ a los 15 DDS; $p = 0.7$ a los 30 DDS y homogeneidad de varianza $p = 0.78$).

5.2.1 Pardeamiento a los 5 DDS

El ANOVA (Anexo B, tabla B4) realizado para la variable porcentaje de pardeamiento a los 5 DDS, no mostró diferencia significativa para la interacción de primer orden entre los factores Protocolo de Desinfección y Cultivares de Anturio, así como para el efecto principal del factor Cultivares. Evidenciando únicamente diferencia estadística significativa para el efecto principal del factor Protocolo de desinfección ($p = 4.75e-10$), por lo tanto, se analizó el efecto promedio de este factor en estudio.

El Protocolo de Desinfección uno difirió estadísticamente del dos en los tres cultivares de *A. andreaum*. El Protocolo uno evidenció el menor porcentaje de pardeamiento con 13,33% en comparación con el dos que alcanzó un 90,77% de pardeamiento de los explantes a los 5 DDS (Figura 13).

Figura 13 Efecto principal o promedio de dos Protocolos de Desinfección en el porcentaje de pardeamiento de explantes de hojas de tres cultivares de *A. andreaeanum* a los 5 DDS en medio de cultivo semisólido.



5.2.2 Pardeamiento a los 15 DDS

El ANOVA (Anexo B, tabla B5), realizado para la variable porcentaje de pardeamiento a los 15 DDS, mostró diferencia estadística significativa solamente para el factor evaluado Protocolo de desinfección ($p = 1.59e-11$) y no evidenció diferencia significativa para la interacción de primer orden entre Protocolo de desinfección y Cultivares de Anturio, así como para el efecto principal del segundo factor Cultivares de Anturio. Por lo tanto, se analizó efectos promedios del factor Protocolo de desinfección.

Transcurrido los 15 DDS de los explantes de las hojas de Anturio en medio de cultivo semisólido, el Protocolo de Desinfección uno difirió del Protocolo dos al mostrar el menor porcentaje de pardeamiento 18,46% en comparación con el 96,77% alcanzado con el Protocolo de Desinfección dos (Figura 14).

5.2.3 Pardeamiento de los explantes a los 30 DDS

El ANOVA (Anexo B, tabla B6) realizado para la variable de respuesta porcentaje de pardeamiento a los 30 DDS, no mostró diferencia significativa para la interacción de primer orden entre los factores Protocolo de Desinfección y Cultivares de Anturio, así como para el efecto principal del segundo factor Cultivares de Anturio. Evidenciando únicamente diferencia estadística significativa para el efecto principal del factor Protocolo de desinfección ($p = 5.77e-10$), por lo tanto, se analizó el efecto promedio de este factor en estudio.

El Protocolo de Desinfección uno difirió estadísticamente del protocolo de desinfección dos en los tres cultivares de Anturio, el Protocolo uno evidenció el menor porcentaje de

pardeamiento 36,33% en comparación con el Protocolo dos que alcanzó el 97,11% (Figura 15).

Figura 14 Efecto principal o promedio de dos Protocolos de Desinfección en el porcentaje de pardeamiento de explantes de hojas de tres cultivares de *A. andreaum* a los 15 DDS en medio de cultivo semisólido.

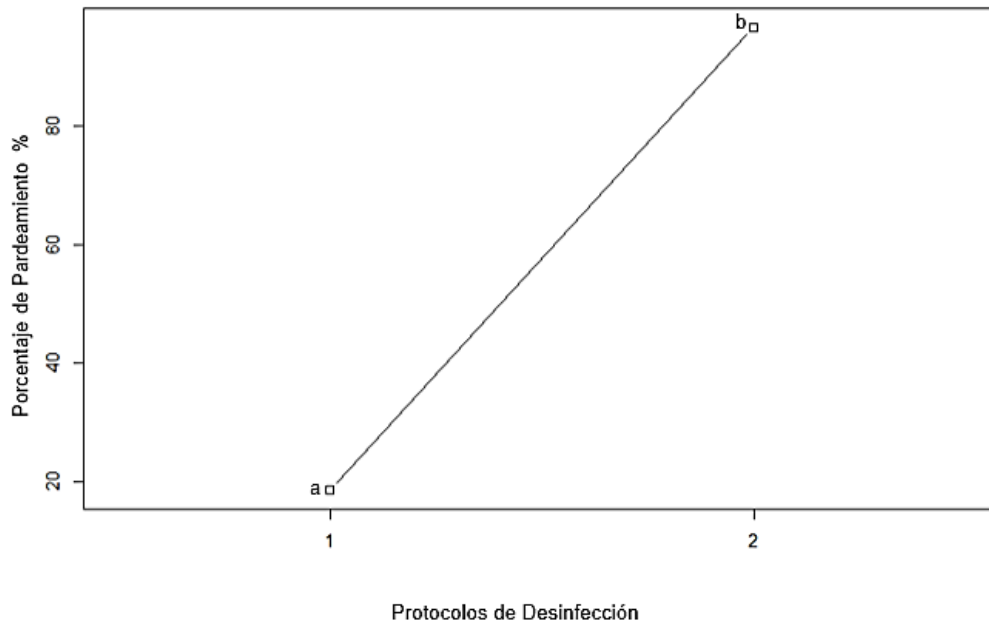
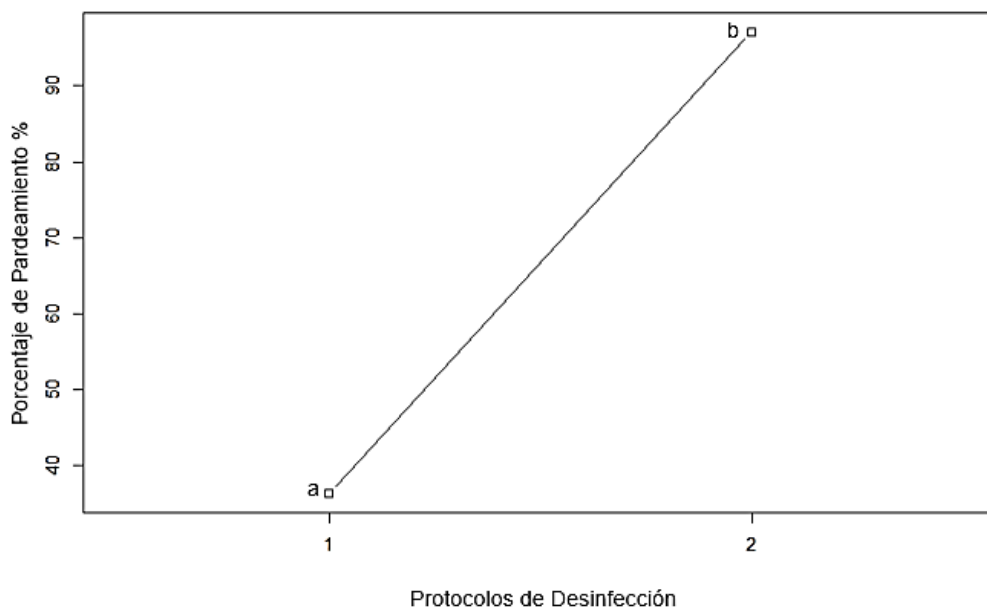


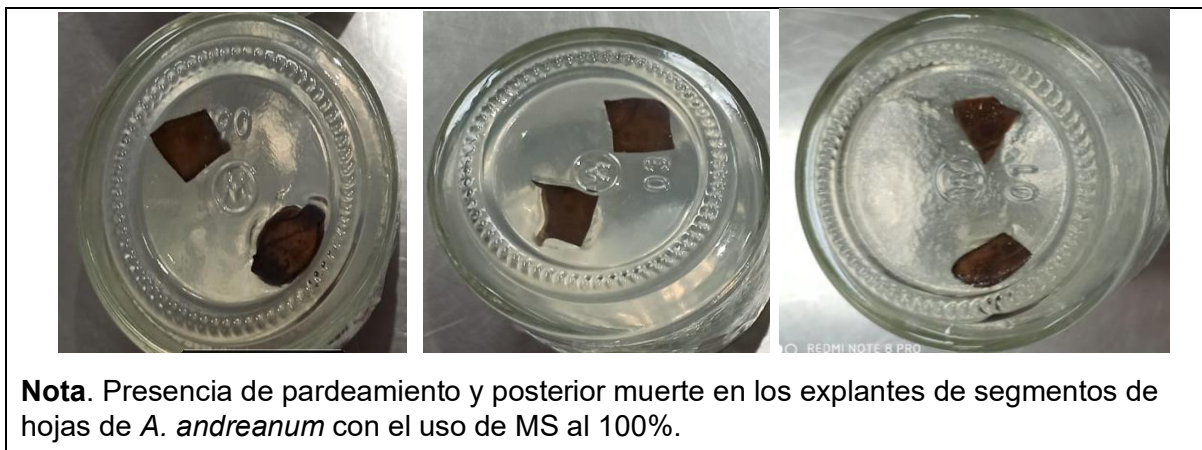
Figura 15 Efecto principal o promedio de dos Protocolos de Desinfección en el porcentaje de pardeamiento de explantes de hojas de tres cultivares de *A. andreaum* a los 30 DDS en medio de cultivo semisólido.



5.3 Medio de cultivo al 100%

Dado que los tratamientos con el medio de cultivo (MS) que contenía los minerales al 100% no indujo respuesta diferente a valores cero para cada uno de las variables a medir, por tal razón no se muestra resultados ni análisis estadístico, como se muestra en la figura 16.

Figura 16 Explantes muertos en el medio de cultivo MS al 100%



5.4 Medio de cultivo al 50%

El medio de cultivo a la mitad de las sales del MS mostró ser adecuado para la micropropagación de *A. andreaum* cv. Blanco, Rosa y Naranja, por ello las variables de respuesta a continuación presentadas se obtuvieron utilizando medio de cultivo MS al 50%.

5.5 Formación de Callo

Los datos registrados para la variable de respuesta formación de callo no presentaron desviaciones severas de los supuestos de normalidad (normalidad $p = 0.02$ y homogeneidad de varianza $p = 0.24$). Las medias registradas del tratamiento control no se tomaron en cuenta para el análisis estadístico, debido a que no indujo formación de callo en ninguna de los tres cultivares de Anturio (cumpliendo su función de control negativo). El ANOVA (Anexo B, tabla B7) realizado para la variable formación de callo, exhibió diferencia estadística altamente significativa para la interacción de primer orden, entre tratamientos (Concentraciones de biorreguladores de crecimiento y Cultivares de Anturio), ($p = 2.32e-13$), por lo tanto, se analizó el efecto simple de cada uno de los factores en estudio.

Los Cultivares de *A. andreaum* Rosa y Naranja presentaron mayor porcentaje de formación de callo con el tratamiento tres, alcanzando promedios del 90 y 88.3% respectivamente, no evidenciando diferencia estadística significativa entre los dos cultivares como se muestra en la figura 17, pero, sí difirieron del cultivar Blanco, que reportó el menor

promedio de formación de callo 2.5% con este tratamiento. Una tendencia similar se observó con el tratamiento cuatro, que indujo formación de callo en los cultivares de *A. andreanum* Rosa y Naranja, en un 55.7 y 46.4% respectivamente, no encontrando diferencias estadísticas significativas entre los dos cultivares, pero, difiriendo del *A. andreanum* Blanco que no evidenció formación de callo,

El *A. andreanum* cv. Blanco respondió únicamente al tratamiento dos, alcanzando un promedio del 27.3% de formación de callo. Sin embargo, este tratamiento no fue idóneo para el *A. andreanum* cv. Rosa, evidenciando el menor promedio 30.7%, y no indujo formación de callo en el *A. andreanum* cv. Naranja. Por otro lado, los tres cultivares no respondieron con formación de callo al tratamiento uno (Tabla 8). Se muestra en la figura 18, el comportamiento que tuvieron las combinaciones hormonales y los cultivares de *A. andreanum* en respuesta a la formación de callo.

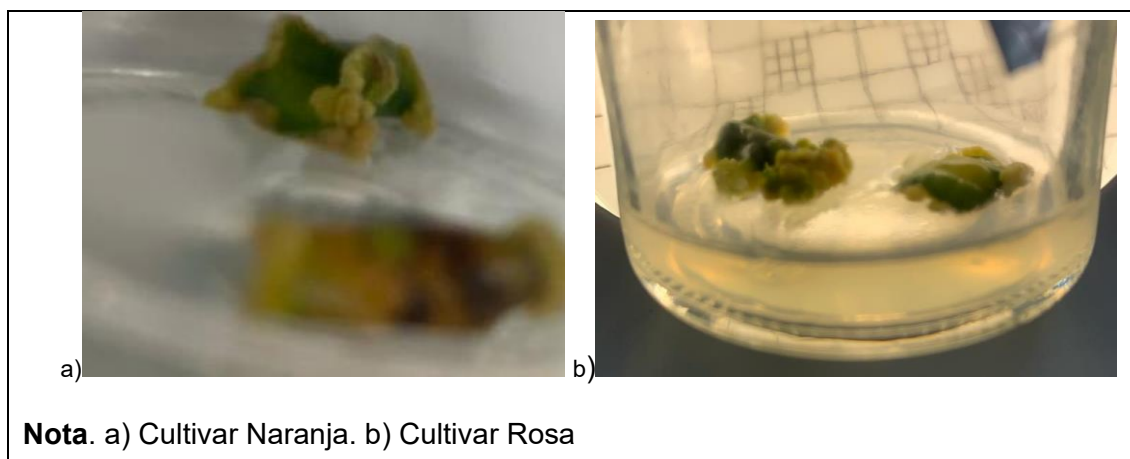
Tabla 8

Respuesta de los explantes de A. andreanum en la variación de la combinación hormonal

	T1	T2	T3	T4
Blanco	0.0 Ba	27.3 Aa	2.5 Bb	0.0 Bb
Rosa	0.0 Da	30.7 Ca	90 Aa	55.7 Ba
Naranja	0.0 Ca	0.0 Cb	88.3 Aa	46.4 Ba

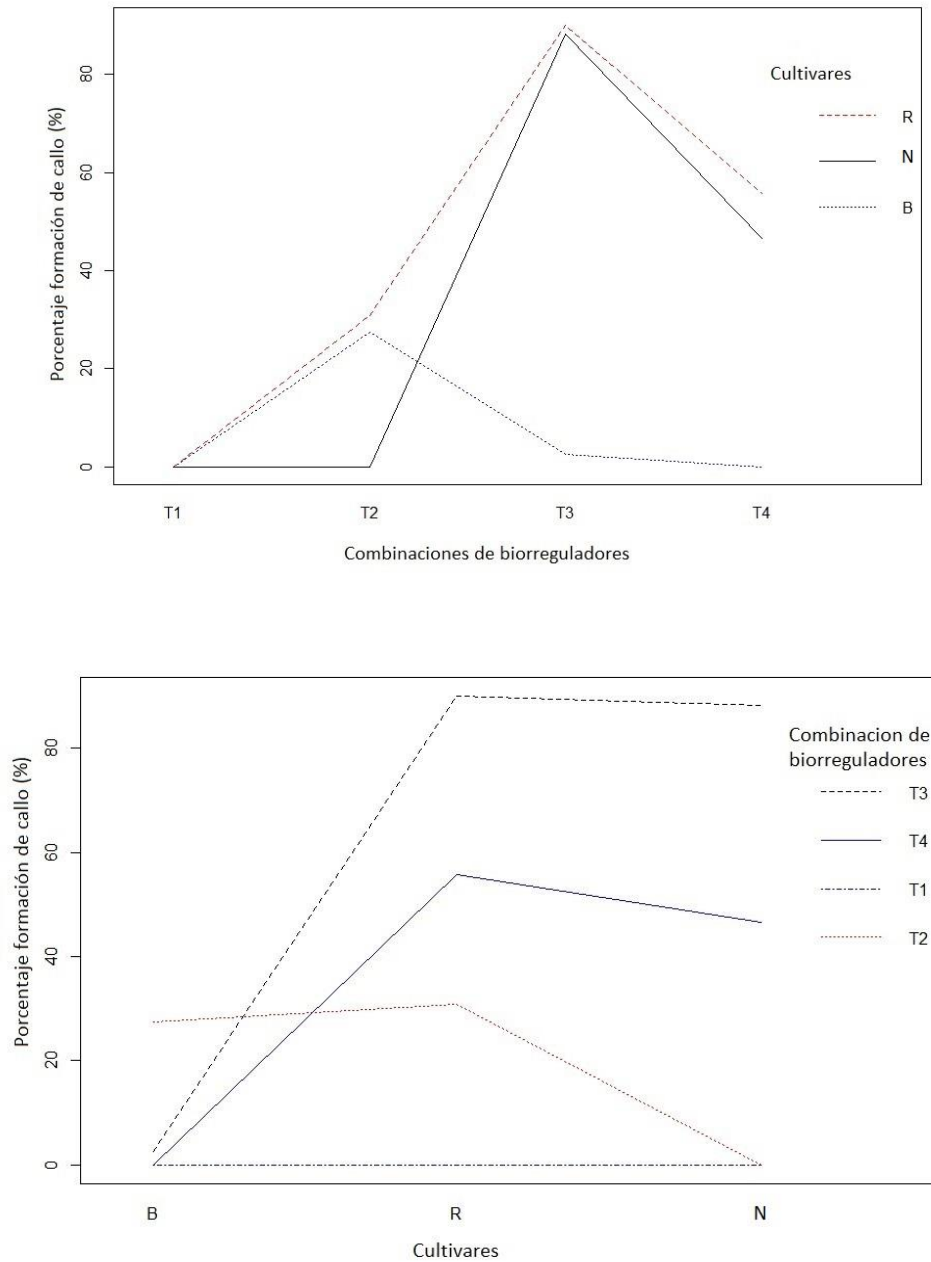
Nota. Las medias etiquetadas con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha = 0,05$) (Etiquetas A, B, C para comparar tratamientos, fijando la cultivar de *A. andreanum*; a, b, c para comparar entre cv. Blanco, Rosado y Naranja, fijando los tratamientos. T1 BAP (5 mg/l) + IBA (0.5 mg/l), T2 KIN (2 mg/l) + ANA (1 mg/l), T3 TDZ (0.5 mg/l) + 2-4 D (0.2 mg/l), T4 BAP (0.5 mg/l) + 2-4 D (0.2 mg/l).

Figura 17 Formación de callos en explantes de segmentos de hojas de *A. andreanum* con el tratamiento 3, utilizando medio de cultivo MS al 50% a los 75 DDS.



Nota. a) Cultivar Naranja. b) Cultivar Rosa

Figura 18 Interacción de primer orden entre los factores en estudio Combinación de biorreguladores y tres cultivares de *A. andreanum* a los 90 DDS en medio de cultivo MS al 50%, en la variable de respuesta porcentaje formación de callo



Nota. Comportamiento de los cultivares Rosa (R), Naranja (N) y Blanco (B) en los cuatro niveles de biorreguladores T1, BAP 5 mg/L + IBA 0.5 mg/L; T2, KIN 2 mg/L + ANA 1 mg/L; T3, TDZ 0.5 mg/L + 2-4 D 0.2 mg/L; T4, BAP 0.5 mg/L + 2-4 D 0.2 mg/L.

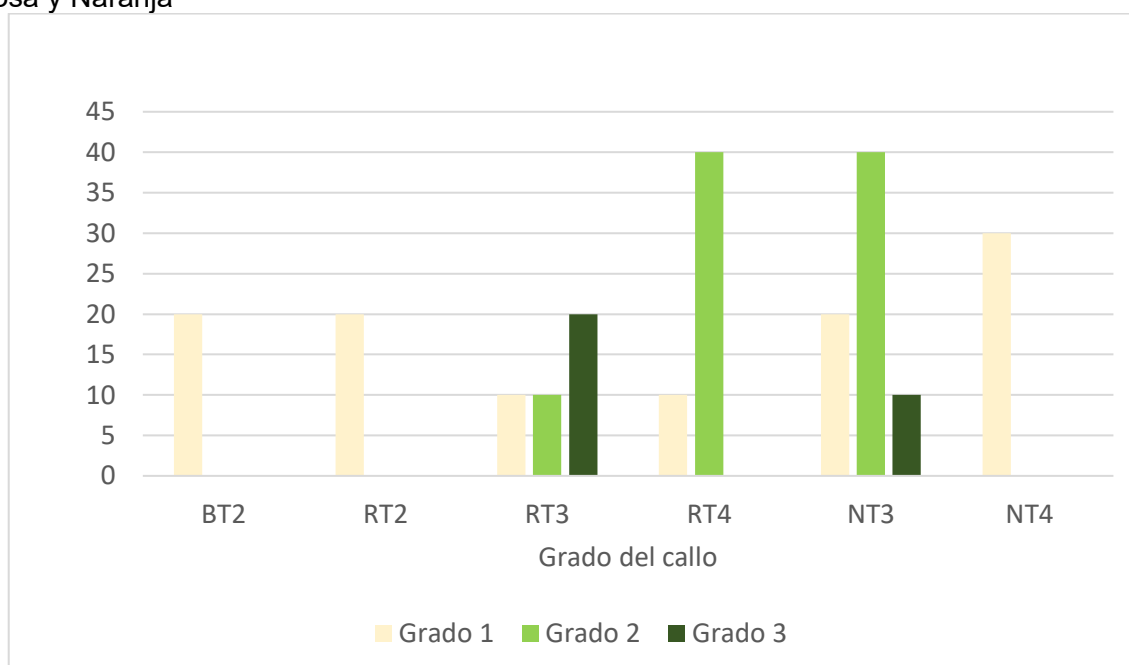
Grado del callo

Se evaluó el grado del callo presente en los explantes de hoja de *A. andreanum* cv. Blanco, Rosa y Naranja a los 75 DDS. En el cultivar Blanco, respondió al tratamiento 2 con un grado de callo G1 y con el tratamiento 3 solo presentó inducción de callo.

En cuanto al cv. Rosa al ser evaluado con el Tratamiento 3, los explantes presentaron los tres niveles de callo, evidenciando un mayor número de explantes con presencia de callo de grado G3. En cambio, al ser estimado con el Tratamiento 4 mostró un grado de callo G1 y G2, con un mayor porcentaje de G2. Finalmente, con el Tratamiento 2 solo mostró un grado de callo G1.

Con respecto al cultivar Naranja al ser evaluado con el Tratamiento 3, los explantes presentaron los tres niveles de callo, evidenciando un mayor número de explantes con presencia de callo de grado G2, seguido del G1 y un número reducido de explantes con G3. En cambio, al ser estimado con el Tratamiento 4 mostró un grado de callo G1, como se muestra en la figura 19.

Figura 19 Grado de callo formado en los explantes de hoja de *A. andreanum* cv. Blanco, Rosa y Naranja



Nota. BT2 [Cultivar Blanco (B), T2 (2 mg/L de KIN + 1 mg/L de ANA)]; RT2 [Cultivar Rosa (R), T2(2 mg/L de KIN + 1 mg/L de ANA)], RT3[Cultivar Rosa (R), T3 (0.5 mg/L de TDZ + 0.2 mg/L de 2-4 D)], RT4 [Cultivar Rosa (R), T4 (0.5 mg/L de BAP + 0.2 mg/L de 2-4 D)]; NT3[Cultivar Naranja (N), T3(0.5 mg/L de TDZ + 0.2 mg/L de 2-4 D)], NT4 [Cultivar Naranja (N), T4 (0.5 mg/L de BAP + 0.2 mg/L de 2-4 D)].

5.6 Número de brotes

Los datos registrados para la variable de respuesta número de brotes no presentaron desviaciones severas de los supuestos de normalidad (normalidad $p = 0.02$ y homogeneidad de varianza $p = 0.31$). Las medias registradas del tratamiento uno y dos no se tomaron en cuenta para el análisis estadístico ya que no evidenciaron valores diferentes a cero, en ninguna de los tres cultivares de *A. andreaum*.

El ANOVA (Anexo B, tabla B8) realizado para la variable formación de callo, expuso diferencia estadística altamente significativa para la interacción de primer orden, entre tratamientos (Concentraciones de biorreguladores de crecimiento y Cultivares de Anturio) como se muestra en la figura 21, ($p = 1.64e-06$), por lo tanto, se analizó el efecto simple de cada uno de los factores en estudio.

El *A. andreaum cv. Rosa* mostró el mayor número de brotes por explante, alcanzando un promedio de 8.5 brotes con el tratamiento tres, difiriendo estadísticamente de todos los demás tratamientos, seguido del tratamiento cuatro, que evidenció una media de 4 brotes por explante con esta misma cultivar. En cambio, al trabajar con el *A. andreaum cv. Naranja*, se consiguió medias de 3 y 2 brotes con los tratamientos tres y cuatro respectivamente, no consiguiendo diferencias estadísticas mínimas significativas entre sí. Finalmente, el Anturio Blanco no evidenció inducción de brotes en ninguno de los tratamientos y periodo de tiempo evaluado por lo que se muestra en la figura 20, los comportamientos de los cultivares con los biorreguladores. De igual manera, los cultivares Rosa y Naranja no evidenciaron formación de brotes bajo los tratamientos uno y dos (Tabla 9).

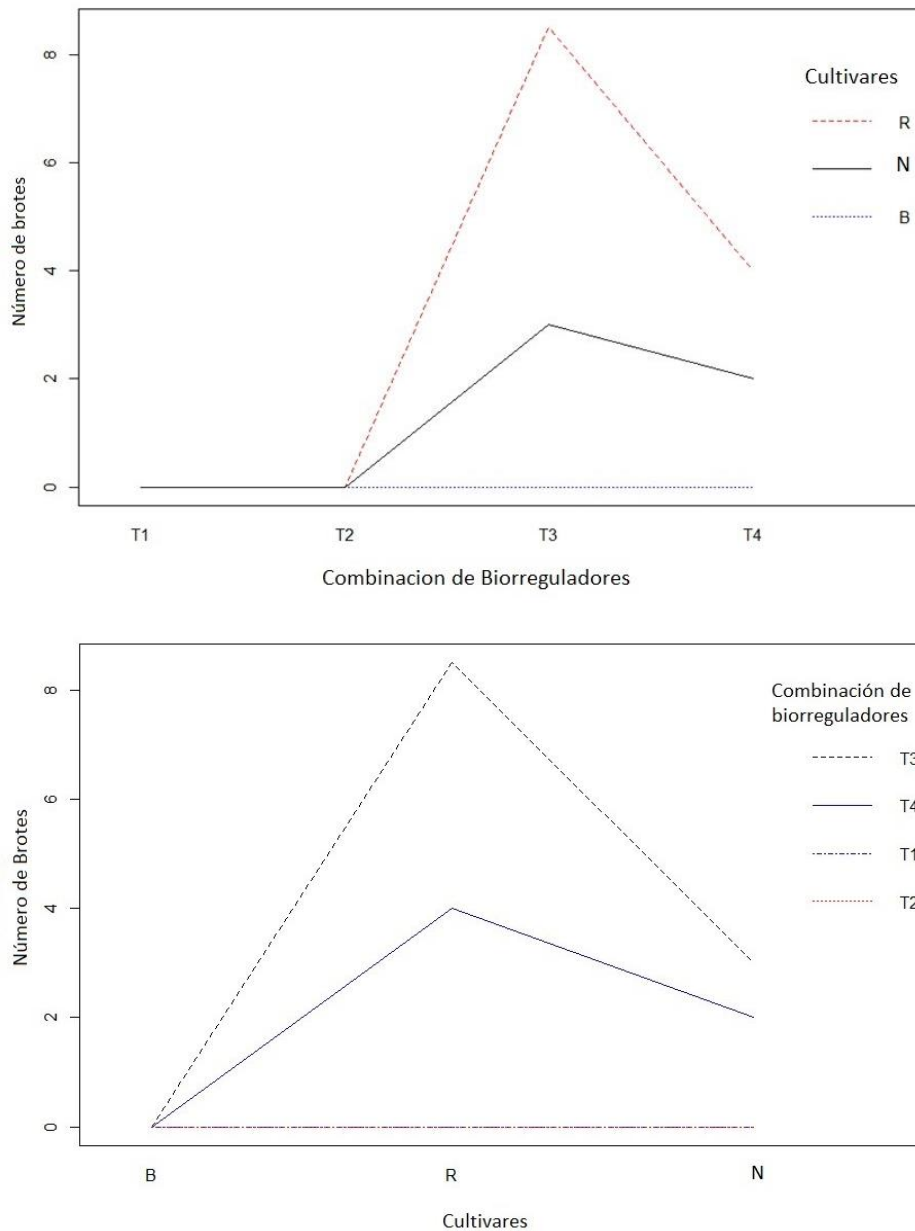
Tabla 9

Efectos de las combinaciones hormonales en el número de brotes a partir de segmentos foliares de A. andreaum cv. Blanco, Rosa y Naranja.

	T1	T2	T3	T4
Blanco	0.0	0.0	0.0 Ac	0.0 Ac
Rosa	0.0	0.0	8.5 Aa	4.0 Ba
Naranja	0.0	0.0	3.0 Ab	2.0 Ab

Nota. Las medias etiquetadas con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$) (Etiquetas A, B, C para comparar tratamientos, fijando la cultivar de *A. andreaum*; a, b, c para comparar entre cv. Blanco, Rosa y Naranja, fijando los tratamientos). T1 BAP (5 mg/L) + IBA (0.5 mg/L), T2 KIN (2 mg/L) + ANA (1 mg/L), T3 TDZ (0.5 mg/L) + 2-4 D (0.2 mg/L), T4 BAP (0.5 mg/L) + 2-4 D (0.2 mg/L).

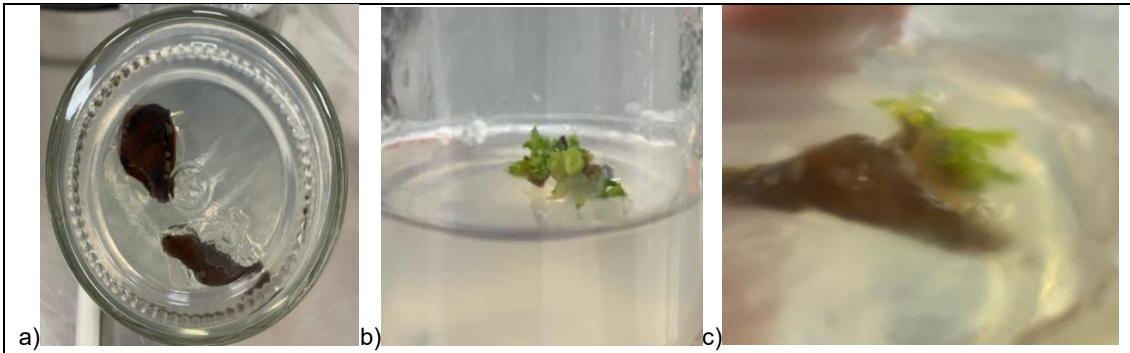
Figura 20 Interacción de primer orden entre los factores en estudio Combinación de biorreguladores y tres cultivares de *A. andreaum* a los 90 DDS en medio de cultivo MS al 50%, en la variable de respuesta número de brotes.



Nota. Comportamiento de los cultivares Rosa (R), Naranja (N) y Blanco (B) en los cuatro niveles de biorreguladores T1, BAP 5 mg/L + IBA 0.5 mg/L; T2, KIN 2 mg/L + ANA 1 mg/L; T3, TDZ 0.5 mg/L + 2-4 D 0.2 mg/L; T4, BAP 0.5 mg/L + 2-4 D 0.2 mg/L.

En la figura 21, se muestra los brotes generados de segmento de hoja de *A. andreaum* en los cv. Rosa y Naranja, en cambio el *A. andreaum* cv. Blanco no logró la formación de brotes en ninguno de los tratamientos probados.

Figura 21 Brotes formados a partir de segmentos de hojas de *A. andreanum*, usando el tratamiento tres



Nota. Brotes formados a los 90 DDS. a) En el cultivar Blanco solo hubo generación de callos, pero no formación de brotes. b) Brotes generados en el cultivar Rosa. c) Brotes del cultivar Naranja

6. DISCUSIÓN

Hay factores que influyen directamente en el éxito o fracaso del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales: especie, el explante usado, las condiciones físicas y condiciones químicas del medio de cultivo (Levitus *et al.* 2010). Para la propagación clonal de Anturios, diversos autores confirman que esta especie responde a bajas concentraciones de sales, evidenciando que concentraciones superiores a 825 mg/L de NH_4NO_3 disminuye drásticamente la formación de callos y brotes (Zhang *et al.*, 2021), esta condición se ha podido observar en las siguientes especies: *A. magnificum* Linden (Hernández *et al.* 2021), *A. andreanum* (Cardoso y Habermann, 2014), *A. Kaohsiung* No. 1 y 2 (Huang *et al.*, 2019), *A. antioquense* Engl. (Murillo-Gómez *et al.* 2014), tal como se evidencia en los resultados de esta investigación que el uso de MS 100% (1650 mg/l de NH_4NO_3) ocasiono pardeamiento con la consiguiente muerte de los explantes.

El mejor protocolo para la desinfección de los explantes a partir de hojas de anturio fue el tratamiento dos (Etanol al 70% por 1 min, NaClO al 1 y 0.5% por 15 y 5 min, respectivamente), con el nivel más bajo de contaminación (0.44%). Sin embargo, este protocolo presento niveles altos de pardeamiento (97.11%), evidenciando ser inadecuado, lo que indica que, concentraciones y tiempo de inmersión altas en NaClO, ocasiona muerte de explantes (Mamani & Murillo 2020). Los resultados obtenidos en este trabajo, concuerda con Huang *et al.* (2019) quienes demostraron que concentraciones mayores a 0.6% de NaClO provoca un pardeamiento del 50 al 100% de los explantes de hojas jóvenes de tres cultivares de Anturio. De igual manera, Valdez *et al.* (2023) al realizar la desinfección de segmentos nodales de *Mentha arvensis* controlaron en un 95 y 100% de contaminantes bacterianos y fúngicos.

A pesar que el protocolo de desinfección uno (Etanol al 70% por 30 s, NaClO al 0.5% por 15 min), muestra una contaminación del 20.04%, presenta un nivel tolerable de pardeamiento de los explantes (36.33%) a los 30 DDS, demostrando ser el tratamiento más idóneo. Estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura científica, Montes *et al.* (2003) consiguen menor contaminación usando hipoclorito en concentraciones iguales o menores al 0.53 %, obteniendo un 94 y 96% de explantes sanos. Así también, Kunisaki (1980) indica que el uso de hipoclorito al 0.25% con una inmersión de 45 min proporciona una supervivencia del 67% de los explantes.

De igual forma, Budiarto (2008) usando espatas como explantes, en tres cultivares de Anturio, consigue una tasa de supervivencia del 90 al 100% al usar una concentración de NaClO al 0.1%. Así mismo, Huang *et al.* (2019) reportan que una concentración de NaClO al 0.45% en la desinfección de hojas de tres cultivares de Anturios, controla en un 95% los agentes contaminantes.

Diversos estudios realizados en Anturio han demostrado que tanto la inducción y el crecimiento del callo se ve altamente afectado por el genotipo (Te-chato *et al.*, 2006; Ya-Ling *et al.*, 2020), concomitante con los resultados expuestos en esta investigación, donde se observa que la inducción de callo utilizando tres cultivares de Anturio oscila entre el 2.5% y el 90% dependiendo del cultivar, la diferencia podría deberse al intrametabolismo de cada cultivar, afectando la división y diferenciación celular (Cardoso & Habermann, 2014). En Anturio, la inducción de callo es fundamental para lograr una micropropagación masiva exitosa (Ya-Ling *et al.*, 2020).

En la presente investigación se consiguió brotes de dos cultivares de *A. andreanum* cv. Rosa y Naranja. Pero, no se logró regenerar brotes de *A. andreanum* cv. Blanco, bajo las condiciones evaluadas, resultados semejantes son reportados por Cardoso y Habermann (2014) quienes no obtienen nuevas plantas del Anturio Blanco con organogénesis indirecta, reportando a este cultivar altamente recalcitrante. Estos mismos autores indican que el uso de BAP ($1,0 \text{ mg/l}^{-1}$) y la ausencia de adición de 2,4-D en el medio de cultivo permite conseguir una regeneración directa de las plántulas de Anturio, condición que no se observó en esta investigación. Nuestros datos obtenidos con respecto a la formación del callo del tratamiento 3 del cultivar Rosa y Naranja (90% y 88.3%), en comparación a Hernández *et al.* (2021) ellos con una concentración de 0.3 mg/l de TDZ genera un 67.5% de callo a partir de secciones foliares en *A. magnificum* Linden

Los diferentes tipos y concentraciones de Biorreguladores son factores que influyen directamente en la inducción y desarrollo del callo de Anturio (Tirado & Perea, 2011); (Martínez *et al.* 2019). En este sentido, los cultivares de Anturio Rosa y Naranja generaron dos veces más callo con el tratamiento que contenía TDZ (0.5 mg/l^{-1}) en comparación con el tratamiento suplementado con BAP (0.5 mg/L^{-1}). Resultados similares son reportados por Gu *et al.* (2012) quienes reportan altos porcentajes de callo a partir de explantes de hojas de *A. andraeanum* Alabama' (83.3%) y 'Sierra' (77.8%) usando TDZ ($1.8 \mu\text{M}$). De igual manera, los investigadores Te-chato *et al.*, (2006) reportan altos porcentajes de formación de callo (86%) y brotes a partir de explantes de hojas, usando un medio de cultivo suplementado con TDZ y BA (0.5 mg/l^{-1}), tras 8 semanas de cultivo. De igual manera, Rivero *et al.* (2006) concuerdan que la adición de TDZ ($6.78 \mu\text{M}$) permite una buena formación de callos (48.6%) en segmentos foliares. Otro estudio realizado por Noroozi *et al.* (2017) en *A. scherzeriamun* obtuvieron el mayor porcentaje de callo con la adición de 2 mg/l^{-1} (BAP) y 0.5 mg/l^{-1} (TDZ).

Lo que permite deducir que el TDZ es uno de los biorreguladores por excelencia para inducir callogénesis en Anturio, ya sea solo o en combinación con otro biorregulador de crecimiento, tal como lo evidencia Winarto *et al.* (2011), quienes consiguieron una mayor tasa de

crecimiento de callo y número de brotes en dos tratamientos suplementados con TDZ (1.5 mg/l^{-1}), con presencia y ausencia de 2,4D (0.25 mg/l^{-1}), no encontrando diferencias estadísticas significativas entre los dos tratamientos, lo que sugiere que el biorregulador 2,4D no influye en la inducción de la callogénesis en Anturio, resultados concomitantes a los reportados en este estudio.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 Conclusiones

Luego de terminada la tesis se puede concluir que:

- El protocolo de desinfección que tuvo mayor porcentaje de supervivencia de explantes y niveles tolerables de contaminación fue el protocolo 1 (Etanol al 70% por 30 s, NaClO al 0.5% por 15 min y 3 lavados con ADE).
- El mejor tratamiento para generar organogénesis indirecta fue el tratamiento 3 para el cultivar Naranja y Rosa generando 3 brotes/explante y 8.5 brotes/explante, respectivamente.
- El cultivar Blanco solo presentó formación de callo con el tratamiento 2 (27.3%) y no hubo formación de brotes en ninguno de los tratamientos.
- El medio de cultivo MS al 50% que contiene 825 mg/L de NH_4NO_3 evidenció ser la mejor concentración para el cultivo *in vitro* de segmentos de hoja de *A. andreanum*.
- Los brotes generados en este trabajo fueron usados para futuras investigaciones.

7.2 Recomendaciones

- Evaluar menores concentraciones de NaClO en el protocolo de desinfección de segmentos de hojas de *A. andreanum*.
- Evaluar el efecto de las combinaciones hormonales en el cultivar Blanco en menor concentración y mayor tiempo para la inducción de callos y regeneración de brotes
- Evaluar concentraciones mayores o menores a 0.5 mg/L^{-1} solo de TDZ, ya que tiene muy buena respuesta en *A. andreanum*.
- Evaluar el efecto de la inducción de callogénesis en los tres cultivares dentro de 90 DDS de los explantes bajo oscuridad.
- Utilizar hojas jóvenes, tiernas y que tengan el brillo característico cuando emergen, hojas de 3 a 5 días.
- Evaluar diferentes combinaciones hormonales para la formación de brotes en un menor tiempo.

8. Bibliografía

- Alchimia. (2021). *Micropropagación de cannabis*. Noticias: <https://www.alchimiaweb.com/blog/micropropagacion-cannabis/>
- Anthura. (2015). *En todo el Mundo*. Sobre Nosotros: <https://www.anthura.nl/sobre-nosotros/en-todo-el-mundo/?lang=es>
- Anthura. (2024). *Plántulas*. Sobre Nosotros: <https://www.anthura.nl/sobre-nosotros/plantulas/?lang=es>
- Bonilla, E. (1974). *El Anturio*. Agrosavia: <https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/21015>
- Budiarto, K. (2008). Micro Propagation of Several Potted Anthurium Accessions Using Spathe Explants. *Jurnal Natur Indonesia*, 11(1), 59-63.
- Bustamante, K., Rocha, P., Sharry, S., Guerra, M., y Niella, F. (2022). Organogénesis directa e indirecta a partir de segmentos nodales, hojas y raíces de *Eugenia involucrata* DC. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 121. <https://doi.org/https://doi.org/10.24215/16699513e102>
- Cardoso, J., y Habermann, G. (2014). Adventitious Shoot Induction from Leaf Segments in *Anthurium andreaeanum* is Affected by Age of Explant, Leaf Orientation and Plant Growth Regulator. *Horticulture, Environmental Biotechnology*, 55(1), 56-62. <https://doi.org/10.1007/s13580-014-0022-9>
- Castillo, M., y Abdelnour, A. (2010). Cultivo in vitro de *Geophila macropoda* (Ruiz & Pav. DC) a partir de embriones cigóticos. *Agronomía Mesoamericana*, 21(1).
- Del Rivero Bautista, N., Agramonte, D., Barbón, R., Camacho Chiu, W., Collado, R., Jiménez Terry, F. y Gutiérrez, O. (2007). Caracterización en umbráculo de plantas de *Anthurium andreaeanum* variedad □Lambada□, obtenidas por embriogénesis somática. *Bioteología Vegetal*, 7(2).
- EcuRed. (2023). *Medio de cultivo Nitsh*. https://www.ecured.cu/Medio_de_cultivo_Nitsh
- Fernández, C., Díaz, M., y Luis, G. (2015). Enraizamiento in vitro de embriones cigóticos de *Acrocomia aculeara* (Jacq.) Lodd ex Mart. *Colombia Forestal*, 19(1), 67-78. <https://doi.org/https://doi.org/10.14483/udistrital.jour.colomb.for.2016.1.a05>
- Finnie, J., y Staden, J. (1986). In vitro culture of *Anthurium andreaeanum*. *Research Unit fot Plant Growth and Development*, 52(3).
- Folgooso, A., Condés, L., y Vicente, F. (2007). *INTRODUCCIÓN AL CULTIVO DEL ANTHURIUM PARA FLOR CORTADA EN LA REGIÓN DE MURCIA*. Mar Menor: Comunidad Autónoma de la Región de Murcia. [https://www.carm.es/web/descarga?ARCHIVO=Innov.%20Tecnol%C3%B3gica%2031.pdf&ALIAS=ARCH&IDCONTENIDO=113007&IDTIPO=60&RASTRO=c498\\$m1259,20538](https://www.carm.es/web/descarga?ARCHIVO=Innov.%20Tecnol%C3%B3gica%2031.pdf&ALIAS=ARCH&IDCONTENIDO=113007&IDTIPO=60&RASTRO=c498$m1259,20538)
- Fundacion Aquae. (2020). *Agua destilada: definción y propiedades*. <https://www.fundacionaquae.org/wiki/que-es-agua-destilada/#:~:text=El%20agua%20destilada%20est%C3%A1%20compuesta,iones%20del%20agua%20de%20origen.>
- Gantait, S., Mandal, N., Bhattacharyya, S., y Das, P. (2008). In vitro Mass Multiplication with Pure Genetic Identity in *Anthurium andreaeanum* Lind. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 18(2), 113-122. <https://doi.org/10.3329/ptcb.v18i2.3361>
- Gu, A., Liu, W., Ma, C., Cui, J., Henny, R., y Chen, J. (2012). Regeneration of *Anthurium andreaeanum* from leaf explants and evaluation of microcutting rooting and growth

- under different light qualities. *HortScience*, 47(1), 88-92. <https://doi.org/https://doi.org/10.21273/HORTSCI.47.1.88>
- Hernández, J., Aramendiz, H., y Cardona, C. (2005). INFLUENCIA DEL ACIDO INDOLBUTIRICO Y ACIDO NAFTALENOACETICO SOBRE EL ENRAIZAMIENTO DE ESQUEJES DE CAÑA FLECHA (*Gynerium sagittatum* Aubl.). *Temas Agrarios*, 10(1), 5-13. <https://doi.org/https://doi.org/10.21897/rta.v10i1.626>
- Hernández, L. (2004). El cultivo del Anthurium. *Cultivos Tropicales*, 25(4), 41-51.
- Hernández, M., García, L., Padrón, Y., O., M., Moreno, L., y Rivero, L. (2021). Formación de callos en *Anthurium magnificum* Linden. *Biotecnología Vegetal*, 21(2), 103-112.
- Huang, Y.-L., Yuan, S.-C., y Chen, F.-C. (2019). Establishment of an Efficient Micropropagation System in Anthurium Hybrids Through In Vitro Callogenesis and Suspension Culture. *The Horticulture Journal*, 89(1), 54-60. <https://doi.org/10.2503/hortj.UTD-112>
- Indacochea, G., y Parrales, J. (2017). *Contribuciones de la UNESUM a la biotecnología vegetal* (1 ed.). Jipijapa: Grupo COMPAS.
- Jiménez, L., Fonseca, M., García, A., Infante, S., y Vázquez, J. (2019). Efecto de diferentes concentraciones de Ácido Indolacético (AIA) en el enraizamiento in vitro de *Dahlia* sp. *Cultivos Tropicales*, 40(1).
- Kelley, D. R., y Estelle, M. (2012). Ubiquitin-Mediated Control of Plant Hormone Signaling. En *Plant Physiology* (Vol. 160, págs. 47-55). American Society of Plant Biologists.
- Kunisaki, J. (1980). In vitro Propagation of *Anthurium andreaeanum* Lind. *HortScience*, 15(4), 508-509.
- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., y Mroginski, L. (2010). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. INTA.
- Mamani, B., y Murillo, R. (2020). MICROPROPAGACIÓN DE DOS VARIEDADES DE FRUTILLA (*Fragaria ananassa* Duch.) EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 7(1), 69-78.
- Martínez, E., Islas, B., Pérez, J., y Bello, J. (2019). Temporary immersion improves in vitro multiplication and acclimatization of *Anthurium andreaeanum* Lind. *Scientia Horticulturae*, 249, 185-191. <https://doi.org/1016/j.scienta.2019.01.053>
- Mesa, D., Romero, A., y Cruz, A. M. (2002). Estudio de diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BAP) en la micropropagación in vitro de la *Leucaena leucocephala* vc Perú. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 36(3), 271-274.
- Mireles, J., Arellano, A., Espinal, A., Sánchez, L., Estrada, A., y Cruz, A. (2015). Reprogramación celular de embriones de *Anthurium andreaeanum* por fitohormonas para micropropagación masiva. *Nova scientia*, 7(15), Nova scientia.
- Montes, S., Morales, C., y Bell, E. (2004). REGENERACIÓN DE PLANTAS DE *Anthurium andreaeanum* Lind MEDIANTE EL EMPLEO DEL CULTIVO In Vitro. *Cultivos Tropicales*, 25(3), 5-7.
- Morales, R., Jadán, M., y Romero, P. (2014). *Micropropagación de Anturio (Anthurium andreaeanum L.) en un sistema de inmersión temporal mediante organogénesis indirecta a partir de secciones de hoja*. [Tesis de Grado, ESPE Universidad de las Fuerzas Armadas]: <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/7735/1/T-ESPE-047633.pdf>
- Mroginski, L., y Roca, W. (1991). Establecimiento de cultivos vegetales in vitro. En *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. (págs. 19-40). Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical.

- Murillo-Gómez, P., Naranjo, E., Callejas, R., y Atehortúa, U. (2014). Micropropagación de la especie nativa *Anthurium antioquiense* Engl. para su conservación. *Agronomía Colombiana*, 32(3), 334-340.
- Noroozi, A., Bagheri, A., Moshtaghi, N., y Sharifi, A. (2017). Optimization of Indirect Regeneration in *Anthurium scherzerianum*. *Journal of Horticultural Science Vol. 31(2)*, 31(2), 354-364. <https://doi.org/10.22067/JHORTS4.V31I2.52890>
- Perea, M., Gonzáles, T., Campos, H., Guillot, G., y Cogua, J. (2009). *Cultivo de tejidos vegetales in vitro*. Bogota: Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.
- PhytoTech Labs. (2014). *Murashige & Skoog (MS) Modified Basal Medium with Gamborg Vitamins*. <https://phytotechlab.com/murashige-skoog-modified-basal-medium-with-gamborg-vitamins.html>
- PhytoTech Labs. (2023). *Nitsch & Nitsch basal salt mixture*. <https://phytotechlab.com/nitsch-nitsch-basal-salt-mixture.html>
- Pierik, R. (1997). *In vitro Culture of higher plants*. Wageningen, The Netherlands: Kluwer Academy Publishers. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-5750-6>
- Pizarro. (2012). *Cultivo de tejidos vegetales (Manual de prácticas)*. Universidad Nacional Autónoma de México . Cautitlán: FESC.
- Prakasha, D., Ramya, G., y Srinivasalu, G. (2017). Morphogenetic Responses In *Anthurium*. *Current Agriculture Research Journal*, 5(1), 135-140. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.12944/CARJ.5.1.16>
- Puccio, P. (2008). *Anthurium andraeanum*. Monaco Nature Encyclopedia: <https://www.monaconatureencyclopedia.com/anthurium-andraeanum/?lang=es>
- Rivero, N. d., Agromonte, D., Barbón-Rodríguez, R., Camacho-Chiu, W., Collado-López, R., Jiménez-Terry, F., . . . Gutiérrez-Martínez, O. (2008). Embriogenesis somática en (*Anthurium andraeanum* Lind.) variedad 'Lambada'. *Ra Ximhai*, 4(1), 135-149.
- Sajid, Z., y Aftab, F. (2009). EFFECT OF THIDIAZURON (TDZ) ON IN VITRO MICROPROPAGATION OF SOLANUM TUBEROSUM L. CVS DESIREE AND CARDINAL. *Pakistan Journal of Botany*, 41(4), 1811-1815.
- Salgado, J. M. (2007). *Cultivo in vitro de Anthurium andraeanum*. <https://repositorio.utp.edu.co/server/api/core/bitstreams/a8881ab5-b5e2-4534-8e8c-613dcce291a8/content>
- Saptaro, R., Maya, M., y Budiani, A. (2017). In Vitro Propagation of *Anthurium andraeanum* cv. Nitta through Organogenesis. *Agrivita Journal of Agricultural Science*, 39(2), 192-200.
- Saran, S., y Kumar, P. (2013). *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. Agra: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1026-9>
- Sharry, S., Adema, M., y Abedini, W. (2015). *Plantas de probeta Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro*. Buenos Aires, Argentina: Edulp .
- Srimoot, N., y Padsri, I. (2018). Assessing genetic diversity of some *Anthurium andraeanum* Hort. cut-flower cultivars using ISSR markers. *Genomics and Genetics*, 11(1 & 2), 1-8.
- Suárez, I. (2020). *Cultivo de tejidos vegetales*. Montería: Editorial Universidad de Córdoba.
- Te-chato, S., Susanon, T., y Sontikun, Y. (2006). Cultivar, explant type and culture medium influencing embryogenesis and organogenesis in *Anthurium* spp. *Songklanakarin Journal of Science Technology*, 28(4), 717-722.
- Thi Oo, K., Myat, A., Yadanar, M., Swa Oo, K., Thein, W., Kyi, L., y Wah, W. (2019). Effect of Different Concentrations and Combinations of BAP and NAA on Micropropagation of *Anthurium* (*Anthurium andraeanum* Linn.) Red. *Journal of Scientific and Innovative Research*, 11(2), 25-30.

- Tirado, A., y Perea, M. (2011). *Cultivo de tejidos vegetales in vitro*. . Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Torres, J., Lecona, C., Silveiro, M., Gutiérrez, F., Ruiz, N., y Santana, N. (2021). Organogénesis directa en piña criolla inducida por 6-bencilaminopurina. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 14(6). <https://doi.org/10.29312/remexca.v14i6.3159>
- Valdez, M., Moríngo, F., Benítez, J., Oggero, A., Nakayama, H., Cazal, C., y Cantero, I. (2023). Protocolo de desinfección y aclimatación para lapropagación in vitro de menta (*Mentha arvensis* L.). *Revista Investigaciones y estudios-UNA*, 14(2), 26-37. <https://doi.org/10.57201/ieuna2323379>
- Winarto, B., Rajmawati, F., y Teixeira, J. (2011). New basal media for half-anther culture of *Anthurium andreaeanum* Linden ex André cv. Tropical. *Plant Growth Regulation*(65), 513–529. <https://doi.org/DOI 10.1007/s10725-011-9622-x>
- Ya-Ling, H., Shih-Chang, Y., y Fure-Chyi , C. (2020). Establishment of an Efficient Micropropagation System in *Anthurium* Hybrids Through In Vitro Callogenesis and Suspension Culture. *The Horticulture Journal*, 89(1). <https://doi.org/10.2503/hortj.UTD-112>
- Zhang, H., Wang, G., Qiao, Y., y Chen, C. (2021). Plant regeneration from root segments of *Anthurium andraeanum* and assessment of genetic fidelity of in vitro regenerates. *In Vitro Celular & Developmental Biology - Plant*(57), 954-964. <https://doi.org/10.1007/s11627-021-10172-6>

9. ANEXOS

Anexo A: Lista de componentes que contienen los medios de cultivo Murashige y Skoog con vitaminas de Gamborg B5 (MS) y el medio Nitsch y Nitsch (NN)

En la tabla A1 se muestra la composición del medio de cultivo MS usado en el trabajo y también se adjunta en la tabla A2 el contenido de nutrientes minerales que posee el medio N y N.

Tabla A1

Composición del medio MS con vitaminas de Gamborg B5 (100%)

Formula	(mg/L)
Nitrato de Amonio	1650
Ácido Bórico	6.2
Cloruro cálcico	332.2
Cloruro de cobalto	0.025
Sulfato cúprico	0.025
Sulfato ferroso	27.8
ácido etilendiaminotetraacético	37.26
Sulfato de magnesio	180.7
Sulfato de manganeso	16.9
Ácido molibdico	0.25
Loduro potásico	0.83
Nitrato potásico	1900
Fosfato potásico monobásico	170
Sulfato de zinc	8.6
Myo-inositol	100
Acido nicotínico	1
Piridoxina	1
Tiamina	10

Fuente: Phyto Tech Labs (2014)

Tabla A2*Composición del medio Nitsch & Nitsch*

Formula	(mg/L)
Nitrato de Amonio	720
Ácido Bórico	10
Cloruro cálcico	166
Cloruro de cobalto	0.025
Sulfato cúprico	
Sulfato ferroso	27.8
Sulfato de magnesio	90.37
Sulfato de manganeso	18.9
Ácido molibdico	0.25
Nitrato potásico	950
Fosfato potásico monobásico	68
Sulfato de zinc	10
D-Biotin	0.05
Ácido Fólico	0.5
Glicina	2
Myo-inositol	100
Acido nicotínico	5
Piridoxina	0.5
Tiamina	0.5

Fuente: Phyto Techn Labs (2023)

Anexo B Análisis estadístico

En este anexo se detallan los análisis de varianza realizados para las variables dependientes en la micropropagación de *A. andreamum*.

Tabla B1

ANOVA para la Variable Porcentaje de Contaminación a los 5 DDS.

Las medias de la variable porcentaje de contaminación a los 5 DDS pasaron los supuestos de normalidad Shapiro-Wilk ($p = 0.2743$) y homogeneidad de varianzas de Levene (0.3135).

	DF	SC	CM	F	p valor
Protocolos de desinfección (D)	1	169.28	169.28	12.068	0.0046 **
Cultivares (C)	2	69.09	34.54	2.463	0.1270
D: C	2	32.11	16.05	1.145	0.3508
Residuales	12	168.32	14.03		

Tabla B2

ANOVA para la Variable Porcentaje de Contaminación a los 15 DDS.

Las medias de la variable porcentaje de contaminación a los 15 DDS pasaron los supuestos de normalidad Shapiro-Wilk ($p = 0.2743$) y homogeneidad de varianzas de Levene (0.3135).

	DF	SC	CM	F	p valor
Protocolos de desinfección (D)	1	876.4	876.4	14.193	0.00268**
Cultivares (C)	2	97.0	48.5	0.785	0.47810
D: C	2	74.3	37.2	0.602	0.56360
Residuales	12	741.0	61.7		

Tabla B3

ANOVA para la Variable Porcentaje de Contaminación a los 30 DDS.

Las medias de la variable porcentaje de contaminación a los 30 DDS pasaron los supuestos de normalidad Shapiro-Wilk ($p = 0.1865$) y homogeneidad de varianzas de Levene (0.3135).

	DF	SC	CM	F	p valor
Protocolos de desinfección (D)	1	1728.7	1728.7	23.936	0.000371***
Cultivares (C)	2	120.9	60.5	0.837	0.456731
D: C	2	79.4	39.7	0.550	0.590958
Residuales	12	866.7	72.2		

Tabla B4

ANOVA para la Variable Porcentaje de Pardeamiento a los 5 DDS.

Las medias de la variable porcentaje de pardeamiento a los 5 DDS pasaron los supuestos de normalidad Shapiro-Wilk ($p = 0.03327$) y homogeneidad de varianzas de Levene (0.782).

	DF	SC	CM	F	p valor
Protocolos de desinfección (D)	1	26989	324.089	324.089	4.75e-10***
Cultivares (C)	2	463	231	2.780	0.102
D:C	2	378	189	2.271	0.146
Residuales	12	999	83		

Tabla B5

ANOVA para la Variable Porcentaje de Pardeamiento a los 15 DDS.

Las medias de la variable porcentaje de pardeamiento a los 15 DDS pasaron los supuestos de normalidad Shapiro-Wilk ($p = 0.782$) y homogeneidad de varianzas de Levene (0.).

	DF	SC	CM	F	p valor
Protocolos de desinfección (D)	1	27597	27597	579.360	1.59e-11***
Cultivares (C)	2	152	76	1.599	0.242
D:C	2	105	52	1.099	0.365
Residuales	12	572	48		

Tabla B6

ANOVA para la Variable Porcentaje de Pardeamiento a los 30 DDS.

Las medias de la variable porcentaje de pardeamiento a los 30 DDS pasaron los supuestos de normalidad Shapiro-Wilk ($p = 0.7232$) y homogeneidad de varianzas de Levene (0.782).

	DF	SC	CM	F	p valor
Protocolos de desinfección (D)	1	27597	27597	579.360	1.59e-11***
Cultivares (C)	2	152	76	1.599	0.242
D:C	2	105	52	1.099	0.365
Residuales	12	572	48		

Tabla B7

ANOVA para la Variable Formación de Callo

Las medias de la variable formación de callo pasaron los supuestos de normalidad Shapiro-Wilk ($p = 0.01$) y homogeneidad de varianzas de Levene (0.2455).

	DF	SC	CM	F	p valor
Combinación de biorreguladores (CB)	3	17431	5810	157.72	6.31e-16***
Cultivares (C)	2	8571	4285	116.33	4.47e-13***

CB: C	6	13518	2253	61.16	2.32e-3***
Residuales	24	884	37		

Tabla B8

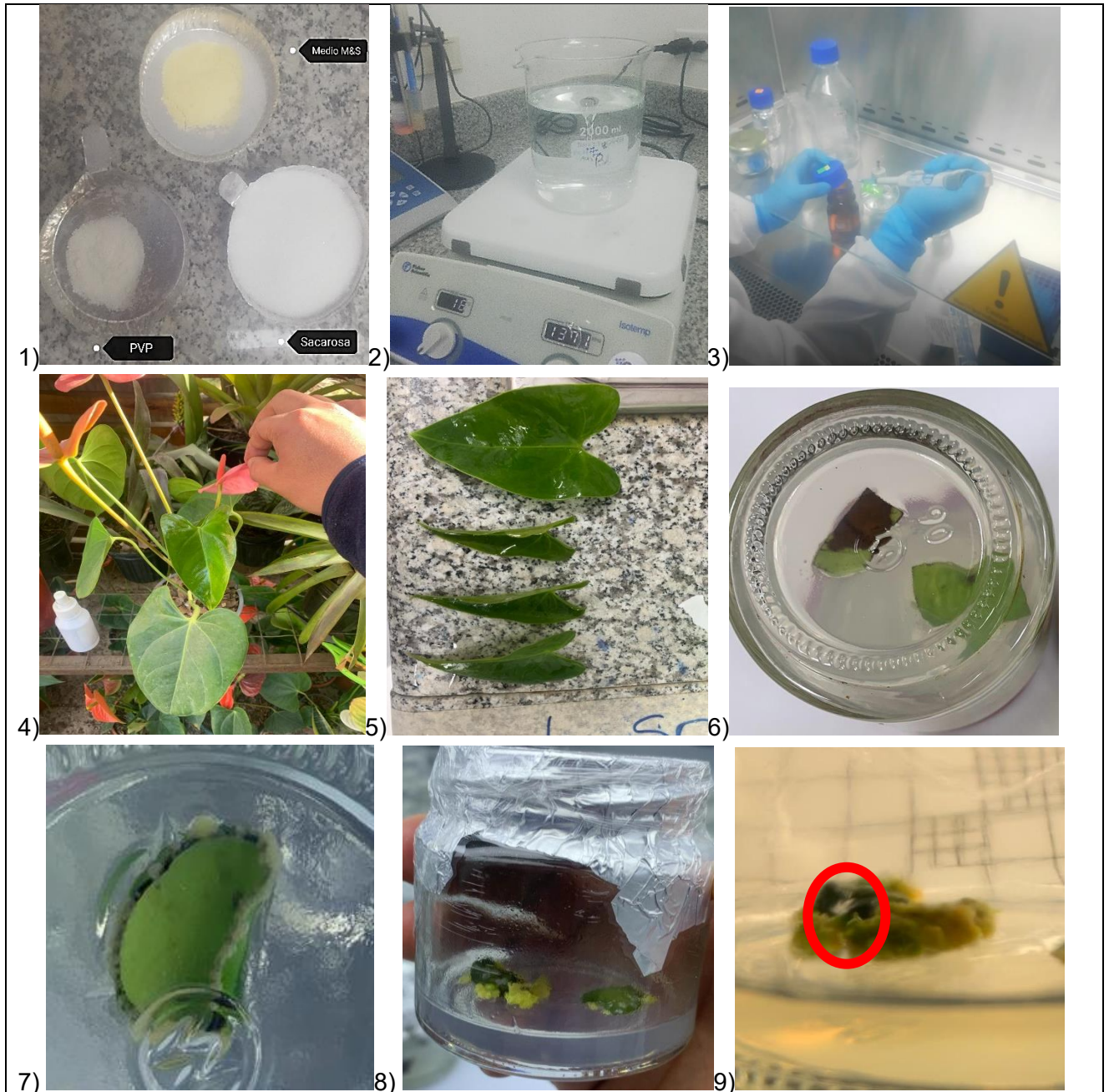
ANOVA para la Variable Número de brotes

Las medias de la variable formación de callo pasaron los supuestos de normalidad Shapiro-Wilk ($p = 0.013$) y homogeneidad de varianzas de Levene (0.58).

	DF	SC	CM	F	p valor
Combinación de biorreguladores (CB)	1	15.13	15.13	17.28	0.001**
Cultivares (C)	2	118.75	59.38	67.85	2.87e-07***
CB:C	2	16.75	8.38	9.57	0.003**
Residuales	12	10.50	0.88		

Anexo C Resumen fotográfico del proceso realizado para la micropropagación *in vitro* de *A. andreaum* a partir de segmentos foliares

En el siguiente anexo se describe el procedimiento efectuado para la micropropagación *in vitro* de los tres cultivares de *A. andreaum*



Nota. 1) Pesar los solutos. 2) Mezclar los reactivos y solvente, ajustar el pH y auto clavar. 3) Colocación de los biorreguladores dentro de cabina de flujo laminar. 4) Extracción de las hojas provenientes de las plantas madres. 5) Limpieza y desinfección de las hojas. 6) Colocación, incubación de los explantes dentro del medio MS a condiciones de obscuridad. 7) Inducción y formación de callo. 8) Colocación de los explantes a un fotoperiodo de 16 horas luz. 9) Formación de brotes.



Universidad
Católica
de Cuenca

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Fabricio Ivan Guzhñay Leon portador de la cédula de ciudadanía N° **0104973714**. En calidad de autor y titular de los derechos patrimoniales del trabajo de titulación **“Evaluación del efecto de cuatro combinaciones hormonales, dos concentraciones de medio en la micropropagación *in vitro* de tres cultivares de Anturio (*Anthurium andreanum*)”** de conformidad a lo establecido en el artículo 114 Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, reconozco a favor de la Universidad Católica de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos y no comerciales. Autorizo además a la Universidad Católica de Cuenca, para que realice la publicación de éste trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, **23 de abril de 2024**

F:

Fabricio Ivan Guzhñay Leon
C.I. **0104973714**