

Establecimiento *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) -variedad Biloxi-

Juan Pablo Aquije Valiente

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano

Honduras

Noviembre, 2020

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Establecimiento *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) -variedad Biloxi-

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por:

Juan Pablo Aquije Valiente

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2020

Establecimiento *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) -variedad Biloxi-

Presentado por:

Juan Pablo Aquije Valiente

Aprobado:



[María Bravo \(Nov 12, 2020 15:27 CST\)](#)

María Alexandra Bravo, M.Sc.
Asesora Principal



Rogel Castillo, M.Sc.
Director
Departamento Ciencia y
Producción Agropecuaria



[Alejandra Sierra \(Nov 12, 2020 17:22 CST\)](#)

Alejandra Sierra, M.Sc.
Asesora



Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Vicepresidente y Decano Académico

Establecimiento *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) -variedad Biloxi-

Juan Pablo Aquije Valiente

Resumen. El incremento en el consumo de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) en los últimos años ha generado grandes oportunidades de producción en diferentes países de Latinoamérica como Perú y Chile. Con el uso de la biotecnología vegetal se ha logrado micropropagar este cultivo, aunque aún se presentan dificultades en especial en la etapa de establecimiento. El objetivo fue evaluar el efecto de 2-isoPentil adenina (2iP) y 6-Bencil aminopurina (BAP) en la formación de brotes y nudos en el establecimiento *in vitro* de microestacas de arándano variedad Biloxi. Se utilizó el medio Lloyd y McCown con 30g/L de sacarosa, pH 5.5 y 8 g/L de Agar. Los tratamientos evaluados fueron un testigo sin regulador de crecimiento, 2 mg/L 2ip y 2 mg/L 2iP + 0.5 mg/L BAP. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 40 repeticiones por tratamiento. Las variables evaluadas fueron número de brotes y nudos. La contaminación general del experimento fue de un 25%. No hubo diferencias significativas para la variable número de brotes por explante. El tratamiento Lloyd y McCown (LM) sin regulador de crecimiento tuvo mejores resultados en la variable número de nudos al día 80 (24.47). El mejor medio para el establecimiento *in vitro* de microestacas de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) -variedad Biloxi- es sin regulador de crecimiento. Se recomienda evaluar el medio en la etapa de multiplicación.

Palabras clave: BAP, brotes, citoquininas, micropropagación, nudos, zeatina.

Abstract. The increase in the consumption of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) in recent years has generated great production opportunities in different countries of Latin American such as Peru y Chile. With the use of plant biotechnology, it has been possible to micropropagate this crop, but it still presents some difficulties especially in the establishment stage. The objective was to evaluate the effect of 2-isoPentyl adenide (2iP) and 6-Benzyl aminopurine (BAP) in the formation of shoots and nodes in the *in vitro* establishment micro cuttings of blueberry variety Biloxi. Lloyd & McCown medium was used with 30 g/L of sucrose, pH 5.5 and 8 g/L of Agar. The evaluated treatments were control without growth regulators, 2 mg/L 2Ip and 2 mg/L 2iP + 0.5 mg/L BAP. A completely randomized experimental design with 40 repetitions per treatment was used. The variables evaluated were number of shoots and nodes. The overall contamination of the experiment was 25%. There were no significant differences for the variable number of shoots per explant. The Lloyd and McCown (LM) treatment without growth regulator had better results in the variable number of nodes at day 80 (24.47). The best medium for the *in vitro* establishment of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) variety -Biloxi- microstakes is without growth regulators. It is recommended to evaluate the medium in the multiplication stage.

Keywords: BAP, cytokinins, micropropagation, nodes, shoots, zeatin.

ÍNDICE GENERAL

Portadilla.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen	iii
Índice general.....	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	6
4. CONCLUSIONES	10
5. RECOMENDACIONES	11
6. LITERATURA CITADA.....	12
7. ANEXOS.....	14

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Promedio de número de brotes por micro estaca en arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.) -variedad Biloxi- establecido <i>in vitro</i> en medio de Lloyd y McCown.).....	7
2. Promedio de número de nudos por micro estaca en arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.) -variedad Biloxi- establecido <i>in vitro</i> en medio de Lloyd y McCown.).....	8

Figuras	Página
1. Plantas madre de <i>Vaccinium corymbosum</i> L. variedad Biloxi.....	3
2. Micro estacas de arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i> var. biloxi) A. Previo a la desinfección dentro de cámara de flujo, B. Cortes realizados a las estacas para su establecimiento en medio de cultivo.....	4
3. Micro estacas de arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i> var. biloxi) A. Micro estacas con brotes al día 28, B. Micro estacas libres de contaminación pero que no desarrollaron, C. Contaminación por hongos.....	6
4. Micro estacas de arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i> var. biloxi). A. Medio sin regulador de crecimiento, B. 2mg/L 2iP, C. 2mg/L 2iP + 0.5mg/L BAP.....	9

Anexos	Página
1. Registro de Aplicación Fitosanitarias de diciembre 2019 a marzo 2020.....	14
2. Registro de aplicaciones Fitosanitarias de marzo a julio 2020.....	15
3. Medio de Cultivo Lloyd y McCown ficha técnica Phyto Technology Laboratories.....	16

1. INTRODUCCIÓN

El arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) es una planta de la familia Ericaceae, perenne que se caracteriza por ser de tipo arbustivo llegando a crecer entre 1.5 y 7 metros. Otra característica importante es que requiere aproximadamente de unas 800 horas de frío para poder iniciar su reproducción. Es originaria de Norte América (EE.UU. y Canadá), sus frutos son bajos en calorías y tienen un alto contenido de fibra, vitamina C y K, además de contener grandes cantidades de antioxidantes (Armando 2016). Debido a estas propiedades, su fruto es altamente consumido en estos países.

Para el año 2013 se dio una producción de 420,379 toneladas, siendo los principales productores Estados Unidos (239,071 mil toneladas) y Canadá (109,007 mil toneladas) representando el 56.9% y 25.9% respectivamente (Armando 2016). En cuanto a América Latina, Perú y Chile son los principales productores en esta región, siendo Perú el principal productor con 3,079 toneladas para los últimos años.

Debido a que este cultivo no es producido todo el año en los países norteamericanos y por su alta demanda, países como Perú y Chile han establecido variedades adaptadas a climas con temperaturas más altas, sin necesidad de alcanzar sus horas de frío. El desarrollo de variedades, como la Biloxi, ha impulsado la exportación en los meses de agosto-diciembre, en los cuales se producen en Latinoamérica (Farje *et al.* 2015).

Esta planta se propaga convencionalmente por enrizamiento de estacas, dada la demanda actual también se micropropaga utilizando meristemos o micro estacas (Undurraga y Vargas 2013). Debido a que los productores requieren grandes cantidades de plantas, se ha optado por la propagación *in vitro* ya que esta permite producir plantas libres de enfermedades y además lograr la producción masiva en un periodo corto de tiempo. La micropropagación se realiza en ambientes controlados, espacios pequeños, comparados con viveros, y menor mano de obra (Hine y Abdelnour 2013).

Según estudios realizados por Arencibia *et al.* (2013) el mejor medio de cultivo para este tipo de cultivo es el Lloyd y McCown conocido como “Woody Plant Medium (WPM)”, con el cual se presentan menos problemas de fenolización. Adicionalmente, observaron que la mejor tasa de propagación se dio cuando utilizaron el regulador de crecimiento 2-isoPentil adenina (2iP) en concentraciones de 1 a 2 mg/L. Aunque otros estudios realizados por Brenes *et al.* (2014) encontraron también buenos resultados utilizando Zeatina como regulador de crecimiento en concentraciones de 0.5 a 1.0 mg/L.

Las citoquininas, como 2iP, Zeatina, Kinetina, 6-Bencilaminopurina (BAP) son usadas en la micropropagación para promover el crecimiento y la multiplicación de los brotes. Con el uso de este tipo de hormonas se espera una mayor generación de brotes por explante y un crecimiento más rápido de estos.

El regulador de crecimiento más utilizado para micropropagar arándano es la 2iP. Estudios realizados por Hine y Abdelnour (2013) demuestran como reguladores de crecimiento derivados

de la adenina generan un mayor número de brotes y nudos ya que genera una mayor elongación en los nuevos brotes a comparación de otras citoquininas utilizadas en este cultivo. Esto es se logra gracias a la división celular en los tejidos vegetales por lo que se observa un mayor tamaño.

A pesar de que el regulador de crecimiento 2iP ha generado buenos resultados en cuanto al crecimiento y desarrollo de los brotes, estudios realizados por Vargas (2014) demuestran que se pueden obtener buenos resultados utilizando BAP en concentraciones de 3 mg/L de medio, ya que este al igual que el 2iP ha generado gran cantidad de hojas y de brotes.

A pesar de tener buenos rendimientos con este medio y con los reguladores de crecimiento se han presentado problemas en la etapa de establecimiento. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de 2iP y BAP en la formación de brotes y nudos durante la etapa de establecimiento *in vitro* de micro estacas de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) variedad Biloxi.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación

El estudio se realizó en el Laboratorio de cultivo de tejidos de la empresa Tarpuy S.A.C. Lima, Perú.

Fuente del explante

Las plantas de arándano fueron proveídas por la empresa Inkas Berries (Figura 1), las cuales son producidas en el invernadero de la empresa ubicado en Huaura, al norte de la región Lima, en el cual se utiliza riego tecnificado e hidroponía. Para el establecimiento *in vitro* se utilizaron micro estacas de 1-3 cm con 1 o 2 yemas (Figura 2).



Figura 1. Plantas madre de *Vaccinium corymbosum* L. variedad Biloxi.



Figura 2. Microestacas de arándano (*Vaccinium corymbosum* var. biloxi). A. Previo a la desinfección dentro de cámara de flujo. B. Cortes realizados a las estacas para su establecimiento en medio de cultivo.

Desinfección del material vegetal fuera de cámara

El método de desinfección se realizó según los estudios de Arencibia *et al.* (2013), con algunas modificaciones. Se recolectaron estacas de aproximadamente 12-15 cm y se procedió a llevarlas al laboratorio, una vez ahí se retiraron las hojas de las estacas y se procedió a su desinfección, se colocaron en un recipiente de vidrio y se lavaron con agua y jabón y se dejó reposar durante 10 minutos. Luego se procedió a sumergirlos en el fungicida Benomil® (Benomilo 500 g/Kg) a una concentración de 1 g/L durante 5 minutos. Después se realizó otra inmersión en el bactericida Phyton 27® (Sulfato de cobre pentahidratado 27%), en una concentración de 2 mL/L durante 10 minutos. Finalmente, se realizaron tres enjuagues con agua destilada.

Desinfección dentro de cámara de flujo laminar

Una vez se introdujo el material vegetal en la cámara para realizar la siembra, primero se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 10% de una solución comercial durante 15 minutos, luego se enjuagó una vez con agua destilada estéril, después se sumergió el material en alcohol al 70% durante 2 minutos y finalmente se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril para eliminar cualquier residuo de los desinfectantes.

Desinfección del material de laboratorio

Los materiales de cristalería y de disección fueron lavados con hipoclorito de sodio de una solución comercial al 10% y enjuagados con agua destilada. Por último, fueron esterilizados en autoclave a una temperatura de 120 - 125 °C a 1 kg/cm² durante 25 minutos.

Medio de cultivo

El medio de cultivo base que se utilizó fue el de Lloyd y McCown “Woody Plant Medium (WPM)” de la empresa Phyto Technology Laboratories, el cual se suplementó con reguladores de crecimiento y con 30 g/L de sacarosa. El pH se ajustó a 5.5 con hidróxido de sodio (NaOH) como alcalinizador y ácido clorhídrico (HCl) como acidificante. Para solidificar los medios se utilizó Agar 8 g/L. La esterilización de los medios se realizó en la autoclave a 120 - 125 °C, 1 kg/cm² durante 25 minutos y se dejaron reposar durante una semana para comprobar que el medio esté libre de contaminantes antes de la siembra de los explantes.

Tratamientos

Se evaluó la respuesta de los explantes a tres tratamientos: sin regulador de crecimiento, 2iP a una concentración de 2 mg/L, y la combinación de 2iP 2 mg/L + BAP 0.5 mg/L.

Establecimiento de los explantes

Al momento de la siembra se realizaron cortes a los extremos de los explantes dejándolos de 6 - 7 cm. Posteriormente se procedió a separar en micro estacas de 2-3 cm con 1-2 yemas cada una para la siembra en el medio estéril.

Incubación

Las condiciones de la incubación de los explantes en el cuarto de crecimiento fueron de 24 °C con una humedad relativa del 80%, la intensidad lumínica fue de 3000 lux con un fotoperiodo de 16 horas luz por 8 horas de oscuridad.

Variables medidas

Los explantes se observaron los días 7, 14, 21, 28 y 80 después de la siembra. Se evaluó la contaminación, fenolización, número de brotes y número de nudos por explante.

Diseño experimental y Análisis estadístico

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar, con tres tratamientos, realizando 40 repeticiones por tratamiento. Para el análisis de los datos se realizó un análisis de varianza y separación de medias por el método de Duncan ($P \leq 0.05$) usando el programa InfoStat.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contaminación y fenolización de los explantes

La contaminación en este experimento fue del 25%. Esta se presentó principalmente a los siete días después del establecimiento. La contaminación por hongos fue mayor que la de las bacterias, al realizar un conteo se encontró un total de 30 plantas contaminadas. De estas 30, el 73% eran por hongos y el 27% por bacterias. Estudios de Brenes *et al.* (2014) reportan una media de contaminación del 54%, por otro lado, estudios realizados por Quispe (2019) reporta que no obtuvieron ningún tipo de contaminación al realizar un protocolo parecido al del estudio con la diferencia de que se realizó un lavado con Tween 20, lo cual ayuda a remover cualquier contaminante físico y no agregaron ningún bactericida o fungicida.

La fenolización se mantuvo por debajo del 7%, siendo inferiores a los reportados por Brenes *et al.* (2014) quienes reportaron un promedio de 26%. Estos resultados pueden indicar que para el establecimiento de micro estacas de la variedad Biloxi, no sería necesario agregar ácido abscísico u otro antioxidante en los medios de cultivo.

Formación de brotes

Se observó que los explantes desarrollaron brotes hasta el día 21 siendo los primeros 7 días en donde crecieron la mayoría de los brotes (Figura 3), pasado ese tiempo no se observó formación de nuevos brotes.

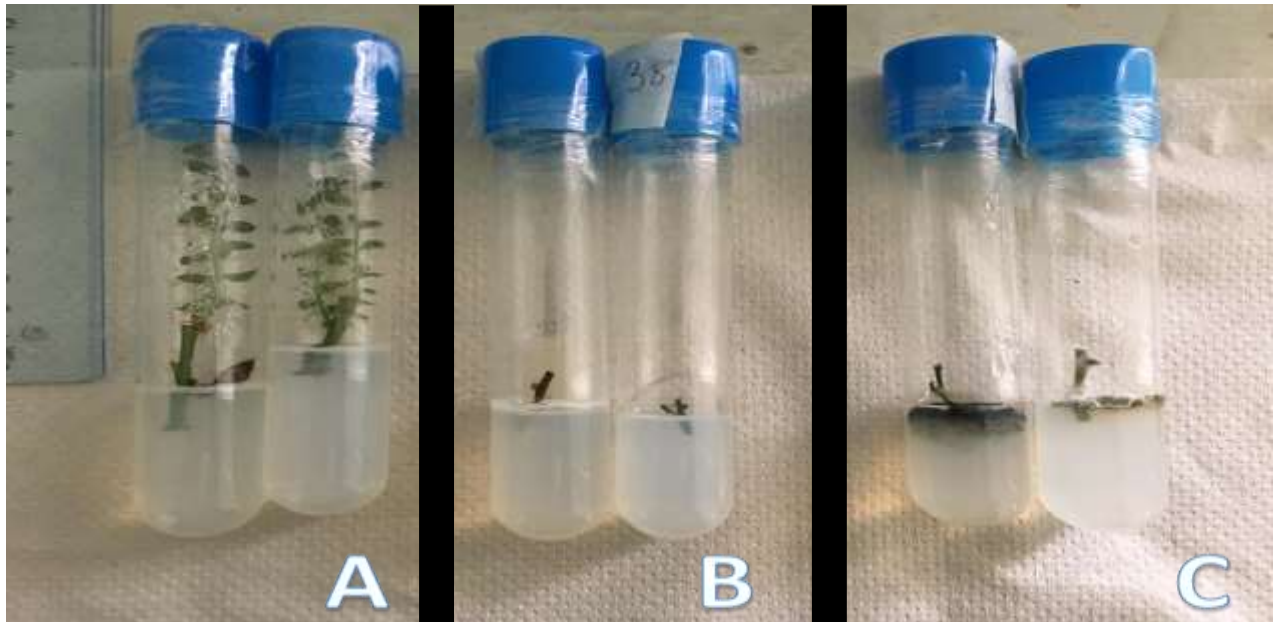


Figura 3. Micro estacas de arándano (*Vaccinium corymbosum* var. biloxi) A. Micro estacas con brotes al día 28, B. Micro estacas libres de contaminación pero que no desarrollaron, C. Contaminación por hongos.

Número de brotes por microestaca

No se observaron diferencias significativas para la variable de número de brotes por explante (micro estaca) (Cuadro 1). Estos resultados demuestran una uniformidad de los explantes establecidos, al poseer aproximadamente un brote por explante para todos los tratamientos y el testigo. Esto concuerda con estudios realizados por Quispe (2019) en el cual muestra aproximadamente un brote por tratamiento utilizando diferentes concentraciones de 2iP y ANA en conjunto. Hine y Abdelnour (2013), reportan resultados similares con un brote por explante al utilizar 2iP o BAP al ser utilizadas en concentraciones de 2.5 mg/L. Sin embargo, indican que las citocininas como forclorfenuron (CPPU) generan hasta dos brotes por explante.

Vargas (2014) usando BAP para estimular el crecimiento de brotes, llegó a obtener dos brotes por explante con un tratamiento de 4.5 mg/L de BAP a los 15 días de haber realizado la siembra. Otros estudios realizados por Shufang *et al.* (2017) demuestran que al utilizar otros reguladores como la Zeatina a 3 mg/L en conjunto con 0.06 mg/L de ácido naftalenacético (ANA) en el medio Anderson Rhododrendon, generan en promedio 2.38 brotes por explantes para la variedad Bluejay perteneciente al género *Corymbosum*. Esto coincide con las investigaciones de Ruzic *et al.* (2012), en las que al utilizar zeatina 0.5 mg/L en conjunto con ácido indol butírico 1 mg/L en el mismo medio Anderson Rhododrendon obtienen resultados de 2.42 brotes por explante.

Cuadro 1. Promedio de número de brotes por micro estaca en arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) -variedad Biloxi- establecido *in vitro* en el medio de Lloyd y McCown.

Tratamiento mg/L	Promedio de brotes/microestaca/día			
	14	21	28	80
Sin regulador	0.89	1.00	1.00	1.00
2 2iP	1.00	1.05	1.00	1.00
2 2iP + 0.5 BAP	1.08	1.08	1.05	1.05
Coefficiente de variación	1.61	0.98	0.70	1.00
R ²	0.05	0.02	0.03	0.03
P	0.3450	0.72	0.5723	0.5723

Número de nudos por explante

Al día 80 después del establecimiento, el testigo presentó mejores resultados con un promedio de 24 nudos por micro estaca (Cuadro 2, Figura 5). Esto difiere con Hine y Abdelnour (2013), que evaluaron el desarrollo de los nudos y hojas en medios con 2iP en donde concluyeron que los tratamientos con 2.5 mg/L de 2iP presentaron mejores resultados que el tratamiento testigo solo en medio Lloyd y McCown con 3% de sacarosa. Reportan que el tratamiento con 2iP llegaba a generar alrededor de 6 nudos por explante al día 35 después de la siembra en el medio a diferencia del testigo que generó 4 nudos.

Estudios realizados por Calisaya y Espinosa (2014) demuestran que al utilizar concentraciones de 8 mg/L de 2iP generaban hasta ocho nudos por explante. Así mismo, concluyeron que la utilización

de ANA tenía un efecto negativo en la formación de nudos ya que los tratamientos en los cuales se utilizó esta auxina en conjunto con el 2iP generaban una menor cantidad de brotes, esto debido a que al aumentar la concentración de auxinas en el medio se ve afectada la altura y la generación de nuevo nudos.

Esto concuerda con estudios realizados por Quispe (2019) en donde utilizando 2 mg/L de 2iP sin combinación de ANA obtuvo un aproximado de 3 cm de crecimiento a los 25 días del establecimiento, mientras que utilizando solo ANA a 2 mg/L se obtuvieron los peores resultados creciendo 1.7 cm en 25 días.

Sin embargo, Vargas (2014) concluyó que su tratamiento en semillas utilizando BAP a 3 mg/L generó hasta ocho nudos por explante a diferencia del testigo que solo se encontraba en medio Murashige y Skoog a mitad de sales y suplementado con sacarosa 2% el cual generó 6 - 7 nudos por explante. Estos resultados demuestran que el uso de ciertas citoquininas no genera diferencia a un medio sin regulador de crecimientos en la formación de nudos.

Cuadro 2. Promedio de número de nudos por micro estaca en arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) -variedad Biloxi- establecido *in vitro* en medio de Lloyd y McCown.

Tratamiento mg/L	Promedio de nudos/microestaca/día			
	14	21	28	80
Sin regulador	1.42	3.42	4.79	24.47 a
2iP	1.33	3.00	4.11	14.00 b
2iP + BAP	1.85	3.42	4.46	15.54 b
Coefficiente de variación	1.70	2.40	2.83	4.76
R ²	0.11	0.07	0.1	0.76
P	0.0992	0.2603	0.1255	< 0.0001

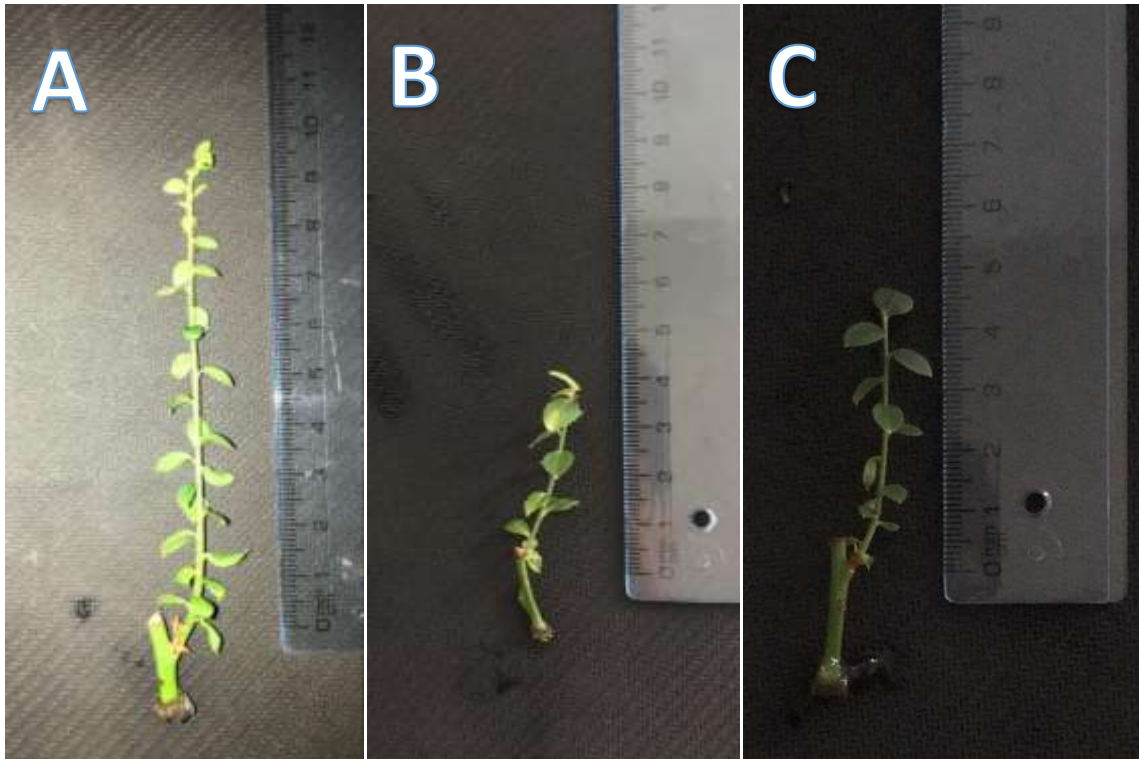


Figura 4. Micro estacas de arándano (*Vaccinium corymbosum* variedad biloxi). A. Medio sin regulador de crecimientos. B. 2 mg/L 2iP, C. 2 mg/L 2iP + 0.5 mg/L BAP.

A pesar de que los resultados demuestran que el tratamiento sin regulador de crecimientos fue el mejor en este estudio, todavía está en discusión si la diferencia entre las variedades a pesar de ser del mismo género y especie (*Vaccinium corymbosum*), puede diferir en la respuesta que tienen las fitohormonas en el desarrollo de brotes y nudos, ya que en los estudios de Quispe (2019) al utilizar esta misma variedad (Biloxi y Misty) obtuvo buenos resultados al utilizar medios con regulador de crecimiento, caso contrario a este experimento. Además de que Shufang *et al.* (2017) utilizaron la variedad Bluejay con diferentes tipos de citoquininas en conjunto con auxinas y encontraron buenos resultados en el desarrollo de brotes y nudos.

Por lo que la variabilidad genotípica que existe entre variedades si puede influir en la respuesta a los reguladores de crecimiento en el desarrollo de los brotes. Pero también existen otros factores que podrían interferir como el estado de la planta madre y el manejo de los explantes al momento de su establecimiento *in vitro*.

4. CONCLUSIÓN

Se logró establecer *in vitro* de micro estacas de arándano- variedad Biloxi- obteniendo el mejor resultado en el medio Lloyd y McCow sin reguladores de crecimiento.

5. RECOMENDACIONES

- Evaluar el efecto del medio Lloyd y McCown sin regulador de crecimiento con 30g/L de sacarosa y pH 5.5 en la etapa de multiplicación.
- Evaluar auxinas en combinación con citoquininas y otras citoquininas como la Zeatina.
- Evaluar la reacción de otro tipo de variedades en medios sin reguladores de crecimiento.

6. LITERATURA CITADA

- Arencibia A, Vergara C, Quiroz K, Carrasco B, Bravo C, Garcia R. 2013. An Approach for Micropropagation of Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) Plants Mediated by Temporary Immersion Bioreactors (TIBs). American Journal of Plant Sciences. 04(05):1022-1028. doi: 10.4236/ajps.2013.45126.
- Armando C, Urrego H. 2016. El arándano en el Perú y el Mundo: Producción, Comercio y Perspectivas. Lima, Perú. MINAGRI-DEEIA; [Consultado el 03 de sep. de 2020]. http://agroaldia.minagri.gob.pe/biblioteca/download/pdf/tematicas/f-taxonomia_plantas/f01-cultivo/el_arandano.pdf
- Brenes A, Castillo R, Gomez L. 2014. Micropropagación de cuatro variedades de arándano (*Vaccinium* spp.) a partir de segmentos foliares de dos procedencias. Agronomía Costarricense. [Consultado el 03 de sep. de 2020]. 39(1):7-23 <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agrocost/article/view/19541/19620>
- Calisaya D, Espinoza G. 2014. Desarrollo de un protocolo para el establecimiento y multiplicación in vitro de *Vaccinium corymbosum* L. (arándano de arbusto alto) variedad Misty, a partir de segmentos nodales en un Reactor de Inmersión Temporal [Tesis]. Perú: Universidad Católica de Santa María. 129 p; [Consultado el 30 de oct. de 2020]. <http://tesis.ucsm.edu.pe/repositorio/bitstream/handle/UCSM/4310/42.0097.IB.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Farje I, Haddad M, Olcese M, Sánchez J. 2015. Creación de una empresa para la producción y exportación de fruta fresca de arándano [Tesis]. Perú: Universidad Privada de Ciencias Aplicadas. 175 p; [Consultado el 03 de sep. De 2020]. https://repositorioacademico.upc.edu.pe/bitstream/handle/10757/583812/PF_M%20-%20PROYECTO%20ARANDANOS.pdf?bitstreamId=2236394&locale-attribute=en
- Hine A, Abdelnour A. 2013. Establecimiento in vitro de arándano (*Vaccinium corymbosum* L). Tecnología en Marcha. [consultado el 03 de sep. de 2020]. 26(4):64-71 https://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/1584/1472
- Quispe A. 2019. Auxinas y citoquininas en la micropropagación de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) de las variedades Biloxi y Misty en Arequipa [Tesis]. Perú: Universidad San Agustín de Arequipa. 100 p; [Consultado el 30 de oct. de 2020]. <http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/10987/IAquamac1.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Ruzic D, Vujovic T, Libiakova G, Cerovic R, Gajdosova A. 2012. Micropropagation in vitro of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). Journal of Berry Research. 2(2):97–103. doi:10.3233/JBR-2012-030

- Shufang F, Dawei J, Xiangying W, Jianjun C, Beeson R, Zhixiang Zhou, Xueming W. 2017. Micropropagation of blueberry 'Bluejay' and 'Pink Lemonade' through *in vitro* shoot culture. *Scientia Horticulturae* 226:227-284 DOI:10.1016/j.scienta.2017.08.052
- Undurraga P, Vargas S. (eds.) 2013. Manual del arándano. Boletín INIA N° 263. 120 p. Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA, Centro Regional de Investigación Quilamapu, Chillán, Chile.
- Vargas D. 2014. Propagación *in vitro* de *Vaccinium corimbosum* (Arándano), hasta la fase de multiplicación [Tesis]. Perú: Universidad Nacional "Santiago Atúñez de Mayolo". 68 p; [Consultado el 08 sep. de 2020]. <http://repositorio.unasam.edu.pe/bitstream/handle/UNASAM/1025/T%20736%202014.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

7. ANEXOS

Anexo 1. Registro de Aplicación Fitosanitarias de diciembre 2019 a marzo 2020
Fuente: Inka's Berries

		REGISTRO DE APLICACIONES FITOSANITARIAS					
Código del Cliente: Carlos Aquije							
Código de despacho: 002 - 000136			Fecha: 07/07/2020				
CASA MALLA 7 : Bloque II C23				Crecimiento: B 9			
Fecha	Etapas/Unidad	Producto Comercial	Ingrediente Activo	Dosis g/L ó ml/L	Tipo de Pesticida	Acción	VoBo Responsable
13/12/2019	c	Alette 80 WG	Fosetil Al	1.5 gr/ L	Fungicida	Sistémico	Karen Chavéz P.
16/12/2019	c	Trichomax	Trichoderma viridae	16 gr/L	Fungicida	Contacto	Karen Chavéz P.
18/12/2019	c	Switch 62.5 WG	Cyprodinil + Fludioxonil	1 gr/L	Fungicida	Sistémico	Karen Chavéz P.
26/12/2019	c	Phyton 27	Sulfato de cobre pentahidratado	1.5 ml/L	Fungicida	Sistémico	Karen Chavéz P.
04/01/2020	c	Absolute 60 sc	Spinothram	0.75 ml/L	Insecticida	Contacto	Karen Chavéz P.
08/01/2020	c	Switch 62.5 WG	Cyprodinil + Fludioxonil	1 gr/L	Fungicida	Sistémico	Karen Chavéz P.
10/01/2020	c	Nativo 75 WG	Trifloxystrobin + tebuconazole	1 gr/L	Fungicida	Sistémico	Karen Chavéz P.
15/01/2020	c	Amistar top	Azoxystrobin + Difeconazole	1.5 gr/ L	Fungicida	Sistémico	Karen Chavéz P.
17/01/2020	c	Tornado wp	Abamectin + Bacillus thuringiensis var. kurstaki	1.5 gr/ L	Insecticida	Contacto	Karen Chavéz P.
17/01/2020	c	Bellis	Piraclostrobin + Boscalid	1.5 gr/ L	Fungicida	Sistémico	Karen Chavéz P.
20/01/2020	c	Alette 80 WG	Fosetil Al	1.5 gr/ L	Fungicida	Sistémico	Karen Chavéz P.
29/01/2020	c	Nativo 75 WG	Trifloxystrobin + tebuconazole	1 gr/L	Fungicida	Sistémico	Karen Chavéz P.
31/01/2020	c	Entrust sc	Spinosad	0.25 ml/ L	Insecticida	Contacto	Karen Chavéz P.
07/02/2020	c	Serenade ASO	Bacillus amyloliquefaciens	7.5 ml/ L	Fungicida	Contacto	Karen Chavéz P.
07/02/2020	c	En Vivo sc	Virus de la poliedrosis nuclear	2 ml/ L	Insecticida	Contacto	Karen Chavéz P.
10/02/2020	c	Amistar top	Azoxystrobin + Difeconazole	1.5 ml/ L	Fungicida	Sistémico	Karen Chavéz P.
12/02/2020	c	Entrust sc	Spinosad	0.25 ml/ L	Insecticida	Contacto	Karen Chavéz P.
17/02/2020	c	Trichomax	Trichoderma viridae	16 gr/L	Fungicida	Contacto	Karen Chavéz P.
19/02/2020	c	Nativo 75 WG	Trifloxystrobin + tebuconazole	1 gr/L	Fungicida	Sistémico	Karen Chavéz P.
03/03/2020	c	Alette 80 WG	Fosetil Al	1.5gr/L	Fungicida	Sistémico	Karen Chavéz P.
06/03/2020	c	Coloso 50 SG	Emamectin benzoato	0.035 gr/L	Insecticida	Contacto	Karen Chavéz P.


FIRMA DEL RESPONSABLE

Anexo 2. Registro de aplicaciones Fitosanitarias de marzo a julio 2020
Inka's Berries

Inka's Berries		REGISTRO DE APLICACIONES FITOSANITARIAS					
Código del Cliente: Carlos AQUIJE							
Código de despacho: 002 - 000136			Fecha: 07/07/2020				
CASA MALLA 7 : Bloque II C23			Crecimiento: B 9				
Fecha	Etapas/Unidad	Producto Comercial	Ingrediente Activo	Dosis g/L ó ml/L	Tipo de Pesticida	Acción	VoBo Responsable
11/03/2020	c	Amistar top	Azoxystrobin +Difeconazole	1.5 gr/ L	Fungicida	Sistémico	Karen Chavéz P.
20/03/2020	c	Switch 62.5 WG	Cyprodinil + Fludioxonil	1 g/L	Fungicida	Sistémico	Karen Chavéz P.
20/03/2020	c	Absolute 60 sc	Spinetoram	0.75 ml/L	Insecticida	Contacto	Karen Chavéz P.
31/03/2020	c	Nativo 75 WG	Trifloxystrobin + tebuconazole	1 gr/L	Fungicida	Sistémico	Karen Chavéz P.
15/04/2020	c	Nativo 75 WG	Trifloxystrobin + tebuconazole	1 gr/L	Fungicida	Sistémico	Karen Chavéz P.
30/04/2020	c	Amistar top	Azoxystrobin +Difeconazole	1.5 gr/ L	Fungicida	Sistémico	Karen Chavéz P.
03/05/2020	c	Nativo 75 WG	Trifloxystrobin + tebuconazole	1 gr/L	Fungicida	Sistémico	Karen Chavéz P.
12/05/2020	c	Amistar top	Azoxystrobin +Difeconazole	1.5 gr/ L	Fungicida	Sistémico	Karen Chavéz P.
01/06/2020	c	Nativo 75 WG	Trifloxystrobin + tebuconazole	1 gr/L	Fungicida	Sistémico	Karen Chavéz P.
15/06/2020	c	Switch 62.5 WG	Cyprodinil + Fludioxonil	1 g/L	Fungicida	Sistémico	Karen Chavéz P.
07/07/2020	c	Aliette 80 WG	Fosetil Al	1.5 gr/ L	Fungicida	Sistémico	Karen Chavéz P.


 FIRMA DEL RESPONSABLE

Anexo 3. Medio de Cultivo Lloyd y McCown Woody Plant de la empresa Phyto Technology Laboratories.



PhytoTechnology Laboratories, LLC™
Helping to Build a Better Tomorrow through Plant Science™

Product Information Sheet

L449
Lloyd & McCown Woody Plant
Basal Medium

Synonym: WPM

Properties

Form: Powder
 Appearance: White to Yellow Powder
 Application: Plant Tissue Culture
 Solubility: Water
 Typical Working Concentration: 2.41 g/L
 Storage Temp: 2 – 6° C
 Storage Temp of Stock Solution: Preparation of concentrated solutions is not recommended as insoluble precipitates may form.
 Other Notes: Contains the macro- and micronutrients and vitamins as described by Lloyd and McCown (1981).
 pH = 3.5 – 4.5

Formula (mg/L)

Ammonium Nitrate	400
Boric Acid	6.2
Calcium Chloride, Anhydrous	72.5
Calcium Nitrate	386
Cupric Sulfate•5H ₂ O	0.25
Na ₂ EDTA•2H ₂ O	37.3
Ferrous Sulfate•7H ₂ O	27.85
Magnesium Sulfate, Anhydrous	180.7
Manganese Sulfate•H ₂ O	22.3
Molybdc Acid (Sodium Salt) •2H ₂ O	0.25

Potassium Phosphate, Monobasic	170
Potassium Sulfate	990
Zinc Sulfate•7H ₂ O	8.6
Glycine (Free Base)	2
myo-Inositol	100
Nicotinic Acid (Free Acid)	0.5
Pyridoxine•HCl	0.5
Thiamine•HCl	1